



M-MLV II Reverse Transcriptase (RNaseH⁻)

产品信息:

组成	AT301-01	AT301-02
M-MLV II (200U/μl)	10000U	10000U×5
5×RT Buffer	500ul	500ul×5

储存条件: -20℃ 保存

制品说明:

本制品是通过基因重组技术克隆表达的点突变型 RNase H 活性缺失的 M-MuLV 反转录酶。一般的野生型 M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) 具有以下几种活性: 依赖于RNA 的 DNA 聚合酶活性; 依赖于DNA 的 DNA 聚合酶活性; RNase H 活性。由于 RNase H 能够催化降解 DNA/RNA 杂合体中的RNA, 因此在 cDNA 第一条链的合成反应中可能会降解 RNA/DNA 杂合体中的模板 RNA。

本酶 M-MLV II (RNase H⁻) 的 RNase H 活性缺失, 与 M-MuLV 相比, 具有更强的延伸能力, 可用于较长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建等。

适用范围: 第一链cDNA 合成。可用低拷贝基因的检测。

第一链cDNA合成(以20μl反应体系为例)

1. 加入

Components	Volume
Total RNA/mRNA	50 ng-5μg/5-500ng
Anchored Oligo(dT)18(0.5μg/μl)	1μl
or Random Primer(N9)(0.1μg/μl)	1μl
or GSP	2pmol
10 mM dNTPs	1μl
5× RT Buffer	4μl
Ribonuclease Inhibitor (50 units/μl)	0.5μl
M-MLV II (RNase H ⁻)	1μl
ddH ₂ O to final volume	20μl

2. 轻轻混匀

如用Anchored Oligo(dT)18或基因特异引物(GSP), 42℃ 孵育50min。

如用Random Primer, 25℃ 孵育10 min, 42℃ 孵育50 min。

3.70℃ 加热15 min失活M-MLV II。

RT-PCR

建议取1/10-1/5 体积(2-4 μl)的反转录产物作为PCR模板。

Components	Volume	Final Concentration
Template	2μl	as required
Forward Primer (10 μM)	1μl	0.2μM each
Reverse Primer (10 μM)	1μl	0.2μM each
10×Taq Buffer (含Mg ²⁺)	5μl	1×
2.5 mM dNTPs	4μl	0.2mM
Taq DNA Polymerase	0.5μl	2.5 units
ddH ₂ O to final volume	50μl	Not applicable

建议PCR条件(以50 μl反应体系为例)

Components	Volume	Final Concentration
Template	2μl	as required
Forward Primer (10μM)	1μl	0.2μM each
Reverse Primer (10μM)	1μl	0.2μM each
10×Taq Buffer (含Mg ²⁺)	5μl	1×
2.5 mM dNTPs	4μl	0.2mM
Taq DNA Polymerase	0.5μl	2.5units
ddH ₂ O to final volume	50μl	Not applicable

PCR 循环

94°C	2-5min	} 30-40 cycles
94°C	30sec	
50-60°C	30sec	
72°C	1-2kb/min	
72°C	5-10min	

注意事项:

1. 避免RNase污染。
2. 为保证反转录成功建议使用高质量的RNA样品。