M-MLV III First-Strand cDNA Synthesis Kit

产品信息：

组成	MT402-01（50次）
M-MLV Ⅲ（200U/μl）	10000U
5×RT Mix	500μl×2
Random Primer(N9)(0.1μg/μl)	60μl
Anchored Oligo$(dT)_{20}$Primer(0.5μg/μl)	60μl
H_2O(RNase free)	1ml×2

存储条件：-20℃保存一年

制品说明：本产品以 RNA 为模板，用高效合成第一链 cDNA，操作简单。

产品特点：

1.M-MLV Ⅲ是通过基因重组技术改造，在大肠杆菌中表达纯化得到的高温反转录酶，去除 RNaseH 活性。可在 40℃-55℃条件下合成第一链 cDNA，具有灵敏度高，特异性高，热稳定性高和半衰期长的特点，可用于较长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建；

2.Anchored Oligo$(dT)_{20}$ 设计独特能锚定 mRNA Poly(A)+ 的 5′端区域，退火位点锚定，特异性高，保证 cDNA 合成效率和成功率；

3.可用 Random Primer （N9）或基因特异引物（GSP）合成第一链 cDNA；

4.合成片段≤15kb；

5.适用于高拷贝基因检测。

操作步骤：

为方便保存和运输本产品所配 Random Primer(N9)和 Anchored Oligo$(dT)_{20}$ 均为干粉，使用前需用 RNase free H_2O 溶解，具体体积参见产品标签。

第一链cDNA合成。(以20 μl反应体系为例)

1.加入

Components	Volume
Total RNA/mRNA	50 ng-5μg/5-500ng
Anchored Oligo(dT)20(0.5μg /μl)	1μl
or Random Primer(N9)(0.1μg/μl)	1μl
or GSP	2pmol
5× RT Mix	4μl
M-MLVⅢ	1μl
ddH2O to final volume	20μl

2.轻轻混匀

如用Anchored Oligo(dT)20或基因特异引物(GSP)，42℃孵育50min。

如用Random Primer(N9)，25℃孵育10 min，42℃孵育50 min。

如果扩不出，可能存在RNA二级结构，建议提高温度从新扩增。

3. 85℃加热15 min失活M-MLVⅢ。

RT-PCR

建议取1/10-1/5 体积(2-4μl)的反转录产物作为PCR模板。

建议PCR条件(以50μl反应体系为例)

Components	Volume
cDNA	2μl
Forward Primer (10μM)	1μl
Reverse Primer (10μM)	1μl
10× Taq Buffer(with Mg^{2+})	5μl
10 mM dNTPs	1μl
Taq DNA Polymerase	0.5-1μl
ddH2O to final volume	50μl

PCR 循环

94℃ 2-5min

94℃ 30sec

50-60℃ 30sec

72℃ 1-2kb/min

30-40 cycles

72℃ 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。