



# M-MLV III Two-Step RT-PCR Kit

## 产品信息:

组成	MT412-01	规格
M-MLV III (200U/μl)	10000U	RT体系/PCR体系 20μl×50次/50μl×80次
5×RT Mix	500μl×2	
Random Primer(N9)(0.1μg/μl)	60μl	
Anchored Oligo(dT) <sub>20</sub> Primer (0.5μg/μl)	60μl	
2×Xerox PCR MasterMix(含染料)	1ml×2	
H <sub>2</sub> O(RNase free)	1ml×2	

**存储条件:** -20℃保存一年。

## 制品说明:

M-MLV<sup>III</sup> 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37℃-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。聚合能力强,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。PCR使用2× Xerox PCR MasterMix扩增。本试剂盒含有从RNA到cDNA,以及PCR扩增cDNA的全部试剂。

## 产品特点:

1. Anchored Oligo(dT)<sub>20</sub>设计独特能锚定mRNA Poly(A)<sup>+</sup>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
2. 可用Random Primer (N9)或基因特异引物(GSP)合成第一链cDNA;
3. 合成片段≤15kb;
4. 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)<sub>20</sub>均为干粉,使用前需用60μl RNase free H<sub>2</sub>O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) <sub>20</sub> (0.5μg/μl)	1μl
or Random Primer(N9)(0.1μg/μl)	1μl
or GSP	2pmol
5× RT Mix	4μl
M-MLV <sup>III</sup>	1μl
ddH <sub>2</sub> O to final volume	20μl

#### 2. 轻轻混匀

如用Anchored Oligo(dT)<sub>20</sub>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,建议提高温度重新扩增。

#### 3. 85℃加热15 min失活M-MLV<sup>III</sup>.

## RT-PCR

建议取1/10-1/5 体积(2-4 $\mu$ l)的反转录产物作为PCR模板。

建议PCR条件(以50 $\mu$ l反应体系为例)

Components	Volume	Final Concentration
cDNA	2 $\mu$ l	as required
Forward Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M each
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M each
2 $\times$ Xerox PCR MasterMix	25 $\mu$ l	1 $\times$
ddH <sub>2</sub> O to final volume	50 $\mu$ l	Not applicable

## PCR 循环

94 $^{\circ}$ C 2-5min

94 $^{\circ}$ C 30sec

50-60 $^{\circ}$ C 30sec

72 $^{\circ}$ C 1-2kb/min

72 $^{\circ}$ C 5-10min

30-40 cycles

## 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。