# M-MLV 4 Two-Step RT-PCR Kit

**产品信息：**

| 组成 | MT413-01 | 规格 |
|---|---|---|
| M-MLV 4（200U/μl） | 10000U | RT体系/PCR体系<br>20μl×50次/50μl×80次 |
| 5×RT Mix | 500μl×2 | |
| Random Primer(N9)(0.1μg/μl) | 60μl | |
| Anchored Oligo(dT)$_{20}$ Primer (0.5μg/μl) | 60μl | |
| 2×Xerox PCR MasterMix(含染料) | 1ml×2 | |
| RNase-free water | 1ml×2 | |

**存储条件：**-20℃保存一年。

**制品说明：**

M-MLV4 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。 M-MLV4 RTase 逆转录时长可短至 5 min。特异性引物为逆转录引物时， M-MLV4 RTase 可在 65℃具有很好的活性。M-MLV4 可在 42℃-65℃条件下以 RNA 为模板合成第一链 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 文库的构建等。

**产品特点：**

1. 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
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)$_{20}$均为干粉，使用前需用RNase-free water溶解，具体体积参见产品标签。

**反转录：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)20(0.5μg /μl) | 1μl |
| or Random Primer(N9)(0.1μg/μl) | 1μl |
| or GSP | 2pmol |
| 5× RT Mix | 4μl |
| M-MLV4 | 1μl |
| RNase-free water to final volume | 20μl |

**注：**如果RNA模板较为复杂，例如具有二级结构、高GC含量等，建议先将RNA模板，引物和RNase-free water混合，68℃孵育10 min，冰浴1 min，然后再加入其它反应成分。

2. 轻轻混匀

如用Anchored Oligo(dT)$_{20}$，42℃-55℃逆转录5-30 min。

如用Random Primer(N9)，25℃孵育10 min，42℃逆转录5-30 min。

如用基因特异引物(GSP)，42℃-65℃逆转录5-30 min。

对于具有复杂结构RNA模板或需扩增长片段序列，建议尽量提高逆转录温度扩增。

3.75℃加热15 min失活M-MLV4。

## PCR扩增

建议取1/10-1/5体积(2-4 μl)的反转录产物作为PCR模板。

1.PCR扩增体系(以50 μl反应体系为例)

| Components | Volume | Final Concentration |
|---|---|---|
| Template | 2μl | as required |
| Forward Primer (10 μM) | 1μl | 0.2μM each |
| Reverse Primer (10 μM) | 1μl | 0.2μM each |
| 2×Xerox PCR MasterMix(含染料) | 25μl | 1× |
| $ddH_2O$ to final volume | 50μl | Not applicable |

2.建议PCR扩增程序

**PCR 循环**

98℃ 2min

98℃ 30sec

50-60℃ 30sec

72℃ 2-4kb/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。