



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 400-699-0631

http:// [www.real-tims.com.cn](http://www.real-tims.com.cn)

E-mail: [real-times@vip.163.com](mailto:real-times@vip.163.com)

## Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H<sup>-</sup>)

### M-MLV 反转录酶(RNase 缺失)

Ver.710658

#### ● 产品货号及规格:

货号	名称	浓度	包装	贮存
RTR2102-01	Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H <sup>-</sup> )	200U/μl	2000U	-20℃
RTR2102-02	5×RT buffer	5×	0.2 ml	-20℃

#### ● 产品简介:

M-MLV 反转录酶(RNase H<sup>-</sup>), 是一种经过改造和优化的反转录酶。和普通的 M-MLV 反转录酶相比, 缺失了 Ribonuclease H (RNase H) 酶活性, 不能够选择性剪切 RNA 和 DNA 杂合双链中的 RNA, 可以合成长片段从 DNA。

本产品中 M-MLV 反转录酶(RNase H<sup>-</sup>)的浓度为 200 U/μl, 用于体积为 20 微升的反转录体系时足够进行 10 次反转录反应。

**特点:** M-MLV 反转录酶(RNase H<sup>-</sup>)可以合成长达 9-13kb 的 cDNA。该反转录酶的最适反应温度为 42-45℃ 并且在 55℃ 时仍然有很高活性, 可以避免普通的 M-MLV 反转录酶(RNase H<sup>-</sup>)在 37℃ 反应时的一些不足。

**用途:** M-MLV 反转录酶(RNase H<sup>-</sup>)常用于在获得总 RNA 或 mRNA 后 cDNA 第一条链的合成。合成的 cDNA 第一条链后续可以用于 PCR、real-time PCR、cDNA 第二条链的合成等。

**来源:** 该反转录酶(RNase H<sup>-</sup>)由大肠杆菌表达

**活性定义:** One unit of the enzyme incorporates 1 nmol of dTMP into a polynucleotide fraction in 10 min at 37°C. Enzyme activity is assayed in 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 40 mM KCl, 0.5 mM dTTP, 0.4 MBq/ml [<sup>3</sup>H]-dTTP 0.4 mM polyA·oligo(dT)<sub>12-18</sub>.

**纯度:** 不含 DNA 内切酶、外切酶和磷酸酯酶和 RNA 酶, 可以满足常规反转录合成 cDNA 第一条链等的需要。

**酶储存溶液:** 50 mM Tris, pH 8.3, 100mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.1% Triton X-100 and 50% glycerol.

**5×RT buffer:** 250 mM Tris, pH 8.3 at 25°C, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT。

**失活或抑制:** 70℃孵育 10 分钟可以导致 M-MLV 反转录酶(RNase H<sup>-</sup>)失活; EDTA、EGTA 等螯合剂、无机磷酸盐或焦磷酸盐以及聚氨(polyamine)对该反转录酶(Rnase H<sup>-</sup>)有抑制作用。

● **使用说明:**

cDNA 第一链合成:

1. 0.2ml PCR 管中配制模板/引物变性混合液:

加样顺序	试剂	使用量
1	模板 RNA	1 ng-1 µg*
2 (后面 3 种任选一种)	Oligo(dT) <sub>18</sub> primer(100 µM) or Random primer(100 µM) or Specific primer(10 µM)	0.5 µl
3	RNase-free 水	Up to 6 µl

注: \* Total RNA 的使用量一般为 1 ng-1 µg; mRNA 的使用量一般为 10 pg-1 µg。

2. 70℃保温 10 分钟后迅速在冰上急冷 2 分钟以上。

注: 此步骤是打开 RNA 的一些比较稳定的二级结构。

3. 离心数秒钟使模板 RNA/引物的变性混合液聚集于离心管底部。

4. 在上述离心管中配制下列反转录反应液。

加样顺序	试剂名称	使用量
1	模板/引物变性混合液	6 µl
2	5×RT buffer	2 µl
3	10mM dNTP	0.5 µl
4 (可选)	RNase Inhibitor(40U/µl)	0.25µl
5	M-MLV(RNaseH <sup>-</sup> )	0.25-1µl*
6	RNase-free 水	up to 10µl

\* 当起始模板 RNA 量>500 ng 时, M-MLV (RNase H<sup>-</sup>)的使用量应>0.25 µl。

5. 若使用 Oligo(dT)<sub>18</sub> 或基因特异性引物, 42℃温育 30 min; 若使用随机引物, 先 30℃温育 5 min, 之后 42℃温育 30 min;

6. 70℃保温 10 分钟后冰上冷却, 得到的 cDNA 溶液可直接用于 PCR 扩增, PCR 扩增时 cDNA 溶液的推荐使用量 50µl 体系加 2 µl。

注: cDNA溶液置于-20℃可保存半年; 置于-80℃可长期储存。