

M-MLV 反转录酶(H⁻)

目录号：AE0401

使用前请仔细阅读说明书

产品说明

MMLV Reverse Transcriptase 来源于莫洛尼氏鼠白血病病毒 (Moloney Murine Leukemia Virus, M-MLV)，具有依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶活性、依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶活性、缺失 RNase H 活性。依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶活性能够以 RNA 为模板链，合成互补的 DNA 链(cDNA)，该活性是反转录酶的主要活性；RNase H 活性能够降解 DNA/RNA 杂合链中的 RNA，在 cDNA 链合成反应中可能会降解 RNA/DNA 杂合链中的模板 RNA，生成 cDNA 单链；依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶活性能够以 cDNA 单链作为模板，合成互补的双链 DNA。

本酶通过基因改造，缺失了 RNase H 活性，经重组表达获得。RNase H 活性的缺失使得其**合成 cDNA 的长度和热稳定性均比野生型 M-MLV 反转录酶有较大提高**。本酶的反应温度提升至 45°C，仍具有较强活性，且延伸能力更强，可用于较长的 cDNA 合成。

活性定义

37°C 条件下，以 Poly(A) - Oligo(dT) 为模板/引物，在 10 分钟内，掺入 1 nmol 的 [³H] dTTP 所需要的酶量定义为 1 个活性单位(U)。

浓度：200U/μl

保存条件：-20°C 保存

特点

- 无 RNase H 活性；
- 合成 cDNA 的长度优于野生型 M-MLV 反转录酶；
- 热稳定性好：最适反应温度为 37-45°C。

适用范围

- 第一链 cDNA 合成
- 全长 cDNA 合成，制备 cDNA 文库；
- RT-PCR 以及 Real Time RT-PCR 反应。。

产品包装规格及组成

Component	AE0401A	AE0401B	AE0401C	AE0401D
M-MLV 反转录酶(H ⁻)	10kU	50kU	50kU × 4	50kU × 10
5 × RT Buffer	0.4 ml	2.0 ml	2.0 ml × 4	2.0 ml × 10
DEPC处理H ₂ O	1.0 ml	5.0 ml	20 ml	50 ml

质量控制

相关测试表明无外源内切、外切脱氧核糖核酸酶污染。PCR 方法检测无宿主残余 DNA。

酶贮存缓冲液

20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.01% Nonidet P40, and 50% glycerol.

注意事项

- 建议在冰上配置 PCR 反应液后，再放入 PCR 仪中进行扩增。这有利于提高扩增的特异性，减少非特异性扩增，得到良好的 PCR 结果。
- 为了降低 RNaseA 污染可能造成的 RNA 降解，导致 cDNA 合成失败，强烈建议每个反应加 1μl RNase Inhibitor。
- RNA 相关实验严格放置 RNase A 污染，操作时需佩戴一次性口罩与手套，并及时更换。
- RNA 在碱性条件下不稳定，避免用高 pH 值溶液溶解 RNA。

应用举例 1 两步法 RT-PCR

● 第一链 cDNA 合成实验

若模板 RNA 是使用 RNA 提取试剂盒提取获得，已经清除了残留基因组 DNA，则可以直接进行以下步骤；否则请先去除 gDNA。

1. 将以下组分加入一个无核酸酶污染的 PCR 管中：

组份	体积/ μ l	终浓度
Oligo(dT) ₂₀ (50 μ M)	1	5.0 μ M
或 Random Primers (25 μ M)		2.5 μ M
或 Specific Primer (10 μ M)		1.0 μ M
RNA Template*	1-5	100ng-1 μ g
Nuclease-free Water	Up to 10	/
总体积	10	/

* Total RNA 的使用量一般为 10 ng~1 μ g；mRNA 的使用量一般为 0.1ng~1 μ g。

2. 将以上混合液在 65-70°C 下温育 5-10 分钟，迅速取出置于冰上冷却 2-3 分钟；

3. 继续配制如下反应混合液：

组份	体积/ μ l	终浓度
上述模板RNA/引物变性溶液	6	/
5 $\times$ RT Buffer (含 DTT)	4	1 $\times$
dNTPs (10.0 mM)	1	0.5 mM
M-MLV RTase (H ⁻) (200 U/ μ l)	0.5	
RNase Inhibitor (40 U/ μ l) *	1	/
Nuclease-free Water	Up to 20	/
总体积	20	/

*可选加，为了降低 RNaseA 污染可能导致的 RNA 降解，建议每个反应加1 μ l。

4. 手指轻柔敲弹混匀后，瞬时离心；

5. 若使用 Oligo(dT)₂₀ 或基因特异性引物，42°C 反应 30-60 分钟；若使用随机引物，首先 25°C 温育 10 分钟，之后 42°C 反应 30-60 分钟；

6. 反应结束后，80°C 保温 1-5 分钟失活 RTase，终止反应。然后冰上冷却，用于后续实验，或立即保存于-20°C。

得到的 cDNA 溶液可直接用于第二链cDNA 的合成或者 PCR 扩增等，PCR 扩增时 cDNA溶液的使用量建议使用 1-5 μ l。

● PCR 扩增目标 cDNA 实验

以上述**第一链 cDNA 合成实验**中获得的含有目标基因的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。以下 PCR 反应举例为 50 μ l 标准 PCR 体系，仅供参考。实际 PCR 条件应根据模板、引物、目的片段大小加以优化，确定最佳反应条件。

按如下配方配制PCR混合液

组份	体积/ μl	终浓度
10 $\times$ Taq Buffer	5	1 $\times$
dNTPs (2.0 mM)	5	0.2 mM
引物 F (10 μM)	1.5	0.3 μM
引物R (10 μM)	1.5	0.3 μM
上述 cDNA 溶液*	1-4	/
Taq (2.5U/ μl)	1.0	2.5U
ddH ₂ O	up to 50	/
总体积	50	/

*50 μl PCR 体系 cDNA template 用量为 10ng-1 μg 。

PCR 反应条件

95 $^{\circ}\text{C}$	5 min	} 30 Cycles
95 $^{\circ}\text{C}$	15 sec	
55~72 $^{\circ}\text{C}$	20 sec	
72 $^{\circ}\text{C}$	1-2kb/min	
72 $^{\circ}\text{C}$	1-5 min	

应用举例 2 一步法 RT-PCR

一步法 RT-PCR 将 RNA 反转录合成 cDNA、目标 cDNA 的 PCR 反应合二为一。以下为一歩法扩增标准体系 (50 μl)。

组份	体积/ μl	终浓度
5 $\times$ RT Buffer	10	1 $\times$
dNTPs (2.0 mM)	5	0.2 mM
引物 F (10 μM)	2	0.3 μM
引物R (10 μM)	2	0.3 μM
总 RNA*	X*	/
Taq (2.5U/ μl)	1.0	2.5U
M-MLV RTase (H ⁻) (200 U/ μl)	0.5	100U
RNase Inhibitor (40 U/ μl)	1	40U
Nuclease-free ddH ₂ O	Z μl	/
总体积	50	/

* Total RNA 的使用量一般为 10 ng~1 μg ；mRNA 的使用量一般为 1ng~1 μg

PCR 反应条件

42 $^{\circ}\text{C}$	30 min	} 30 Cycles
95 $^{\circ}\text{C}$	3 min	
95 $^{\circ}\text{C}$	15 sec	
55~72 $^{\circ}\text{C}$	20 sec	
72 $^{\circ}\text{C}$	1-2kb/min	
72 $^{\circ}\text{C}$	3 min	

警告: 本产品仅限科研实验使用，临床应用安全性和有效性未鉴定，不可用于医疗临床诊断。