

## 产品说明书

|      |   |
|------|---|
| 产品名称 | M-MLV Reverse Transcriptase   |
| 来源   | 大肠杆菌重组表达  |
| 货号   | CSB-DEM025  |
| 产品形态 | 液体  |
| 酶活   | 200 U/ $\mu$ L  |
| 储存条件 | -20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C  |
| 分子量  | 74 kDa  |
| 保存缓冲 | 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.01% NP-40、50% glycerol   |
| 活性定义 | 以 Poly(rA) $\cdot$ Oligo d(T) <sub>15</sub> 为模板的 50 $\mu$ L 反应体系中, 37 $^{\circ}$ C 10 min 内将 1 nmol dTTP 掺入到酸不溶性物质所需的酶量是 1 活性单位 (U) |
| 质量控制 | 无核酸外切酶、DNase 和 RNase 活性, PCR 检测无宿主基因组残留   |
| 有效期  | 24 个月   |

### 产品说明

M-MLV Reverse Transcriptase 是经基因工程改造的反转录酶, 降低了 RNase H 活性, 提高了热稳定性, 可以比野生型的 M-MLV 在更高的温度下合成第一链 cDNA。本产品在 50-60 $^{\circ}$ C 均有正常活性, 具有更高的特异性、更高的产量且可以合成长达 12 kb 的 cDNA。

### 产品组分

| 组分编号 | 组分名称                           | 规格(50T) | 规格(100T) |
|------|--------------------------------|---------|----------|
| 1    | 5 $\times$ First-Strand Buffer | 0.3mL   | 0.6mL    |
| 2    | M-MLV Reverse Transcriptase    | 10000U  | 20000U   |

### 操作说明

#### 第一链 cDNA 合成 (简易流程)

按下表添加并混合各组分, 55 $^{\circ}$ C 孵育 0.5H。如果使用随机引物, 建议在 55 $^{\circ}$ C 反应前先将反应体系置于 25 $^{\circ}$ C 反应 5 min。

| 组分                                       | 加入量          |
|--|--------------|
| ddH <sub>2</sub> O                       | Up to 20 μL  |
| 5× First-Strand Buffer                   | 4 μL         |
| RNA 模板                                   | 50 pg -1 μg* |
| 50 μM d(T) <sub>23</sub> VN 或 60 μM 随机引物 | 2 μL         |
| 10 mM dNTPs                              | 1 μL         |
| RNase Inhibitor (40 U/μL)                | 0.2 μL       |
| M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μL)   | 1 μL         |

注: 1 ng-1 μg 总 RNA 模板或 50 pg-100 ng Poly(A)-RNA。在 95 °C 3min 使酶失活。对于下游 PCR 应用, 逆转录产物的加入体积不应超过 PCR 反应总体积的 1/10。

#### 第一链 cDNA 合成 (标准流程)

如果需要变性模板 RNA, 请使用以下方案。

在无 RNase 的 PCR 管中加入 RNA 模板和 d(T)<sub>23</sub>VN 引物。

| 组分                                       | 加入量          |
|--|--------------|
| RNA 模板                                   | 50 pg -1 μg* |
| 50 μM d(T) <sub>23</sub> VN 或 60 μM 随机引物 | 2 μL         |
| 10 mM dNTPs                              | 1 μL         |
| ddH <sub>2</sub> O                       | Up to 10 μL  |

\*注: 1 ng-1 μg 总 RNA 模板或 50 pg-100 ng Poly(A)-RNA。

将以上体系置于 65°C 下反应 5min, 使 RNA 模板/引物变性后短暂离心并迅速置于冰上 2min。

然后向上述 PCR 管中加入以下组分:

| 组分                        | 加入量         |
|---------------------------|-------------|
| ddH <sub>2</sub> O        | Up to 20 μL |
| 上一步变性的 RNA 模板/引物          | 10μL        |
| 5× First-Strand Buffer    | 4 μL        |
| 100 mM DTT                | 2 μL        |
| RNase Inhibitor (40 U/μL) | 0.2 μL      |

M-MLV Reverse Transcriptase(200 U/ $\mu$ L)

1  $\mu$ L

混匀后, 55°C 孵育 0.5H。如果使用随机引物, 建议在 55°C 反应前先将反应体系置于 25°C 反应 5 min。

95°C 加热 3 min 使酶失活, 逆转录产物储存在-20°C。对于下游 PCR 应用, 逆转录产物的加入体积不应超过 PCR 反应总体积的 1/10。

### 一步法 RT-qPCR 反应

可使用本公司优化的 One Step RT-qPCR KIT 进行测试。一般情况下一个反应推荐 M-MLV Reverse Transcriptase 浓度为 20-30U/30 $\mu$ L 之间, 扩增条件如下:

推荐的 PCR 反应程序

| 温度      | 时间       | 循环数   |
|---------|----------|-------|
| 55-60°C | 5-10 min | 1     |
| 95°C    | 3 min    | 1     |
| 95°C    | 15-30 s  |       |
| 45-68°C | 15-60 s  | 40-45 |
| 68°C    | 1 kb/min |       |