

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

**R101**

## 产品简介

M-MLV (H<sup>-</sup>) Reverse Transcriptase (Moloney Murine Leukemia Virus, 莫洛尼鼠白血病病毒) 通过对野生型 M-MLV 逆转录酶基因改造, 在大肠杆菌中表达纯化而成, 具有依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶活性; 依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶活性; 无 RNase H 活性。本品具有合成能力高, 热稳定性好和半衰期长的特点。与常见的通过删除 RNase H 结构域方法得到的突变体相比, 本产品保留了完整的蛋白结构, 因此具有与野生型相同的聚合酶活性, 可用于较长的 cDNA 合成以及全长 cDNA 文库的构建等, 同时具有链置换活性, 可用于 5' RACE 等实验。

## 产品组成

组分	R101 (10,000 U)
5 × RT Buffer	500 μl
M-MLV (H <sup>-</sup> ) Reverse Transcriptase (200 U/μl)	50 μl

## 储存条件

-20°C保存, 于-20 ~ 0°C运输。▲避免反复冻融。

## 单位定义

以 Poly (rA)-Oligo (dT) 为模板/引物, 在 37°C, 10 min 条件下, 掺入 1 nmol 的 dTTP 为酸不溶性物质所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

## 质量控制

### 核酸外切酶残留检测:

200 U 本品和 50 pmol 单链 DNA 底物在 37°C下孵育 16 h, 经变性 PAGE 电泳, DNA 的电泳谱带不发生变化。

### 核酸内切酶残留检测:

200 U 本品和 0.5 μg 质粒 DNA 在 37°C下孵育 4 h, 经琼脂糖凝胶电泳, 质粒的电泳谱带不发生变化。

### RNase 残留检测:

200 U 的本品和 1 μg RNA 在 37°C下孵育 30 min, 经琼脂糖凝胶电泳, RNA 的电泳谱带不发生变化。

### 大肠杆菌 DNA 残留检测:

60 U 本品中残留的核酸经 *E.coli* gDNA 特异性的 qPCR 检测, *E.coli* 基因组残留低于 10 拷贝。

### 功能检测:

逆转录体系中加入 200 U 本酶,以 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 为模板,Oligo (dT)<sub>18</sub> 为引物,42°C反应 45 min。取 1/10 cDNA 产物进行 PCR 扩增 VIN 基因。琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,可见有单一的 4.6 kb 条带。

## 实验方案

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液:

组分	用量
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	to 20 $\mu\text{l}$
5 $\times$ RT Buffer	4 $\mu\text{l}$
dNTP Mix (10 mM Each)	1 $\mu\text{l}$
Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer (50 $\mu\text{M}$ )	
or Random Hexamers (100 ng/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
or Gene Specific Primers GSP (2 $\mu\text{M}$ )	
RNasin (40 U/ $\mu\text{l}$ )*	1 $\mu\text{l}$
M-MLV (H <sup>-</sup> ) Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
Total RNA/mRNA	50 ng ~ 5 $\mu\text{g}$ /5 ~ 500 ng

\* 本实验中需要加入 RNase 抑制剂,可选用本公司 ATG® RNasin (ATG #RR101)。

按下列条件进行第一链合成反应:

使用 Oligo (dT)<sub>18</sub>

温度	时间
42°C	45 min*
85°C	5 min

使用 Random hexamers

温度	时间
25°C	10 min
42°C	45 min*
85°C	5 min

使用 Gene Specific Primers

温度	时间
42 ~ 65°C*	45 min*
85°C	5 min

\* 高温适合高 GC 及长链 RNA 逆转录;时间可在 30 ~ 60 min 间调整,延长逆转录时间可能有助于获得更长的 cDNA (>5 kb)。

## 注意事项

1. 85°C 5 min 为逆转录酶灭活步骤。
2. cDNA 产物可在-20°C储存或立即用于 PCR 反应。
3. 用于 PCR 反应的 cDNA 产物体积建议不超过 PCR 反应体积的 1/10。