

M-MLV (H-) Reverse Transcriptase II

R111

产品简介

M-MLV (H-) Reverse Transcriptase II (Moloney Murine Leukemia Virus, 莫洛尼鼠白血病病毒), 为 M-MLV (H-) Reverse Transcriptase (ATG#R101) 改造升级版。该酶是在野生型 M-MLV 逆转录酶基因基础上经过点突变改造, 并通过特殊工程菌表达纯化而成, 在保留上一代酶活性如依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶活性、依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶活性、无 RNase H 活性的基础上, 又再次提高了逆转录效率和耐热温度, 使其逆转录温度可达 72°C, 从而增强了对 RNA 复杂二级结构的耐受性。本品具有合成能力高, 热稳定性好和半衰期长等特点。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。

产品优点

逆转录效率高

耐热温度高

保真度高

耐受复杂二级结构 RNA

无 RNase H 活性

产品组成

组分	R111 (10,000 U)
M-MLV (H-) Reverse Transcriptase II (200 U/μl)	50 μl
5 × RT Buffer	500 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 本品，以 1 μg 总 RNA 为模板，Oligo (dT)₁₈ 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。

产品应用

IVD 分子诊断；

RT-qPCR/RT-LAMP/RT-RPA；

cDNA 合成及文库构建；

5' RACE。

实验方案

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液：

RNase Free ddH ₂ O	to 20 μl
5 × RT Buffer	4 μl
dNTP Mix (10 mM Each)	1 μl
<hr/>	
Oligo (dT) ₁₈ Primer(50 μM)	
or Random Hexamers (100 ng/μl)	1 μl
or Gene Specific Primers GSP (2 μM)	
<hr/>	
RNasin (40 U/μl)*	1 μl
M-MLV (H ⁻) Reverse Transcriptase II (200 U/μl)	1 μl
Total RNA / mRNA	50ng-5 μg / 5-500ng
<hr/>	

* 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)₁₈

42-65°C	15-45 min*
---------	------------

使用 Random hexamers

25°C	10 min
42-65°C	15-45 min*

使用 Gene Specific Primers

42-75°C	15-45 min*
---------	------------

* 可在 15-60 min 间调整。延长逆转录时间可能有助于获得更长的 cDNA (>5 kb)。

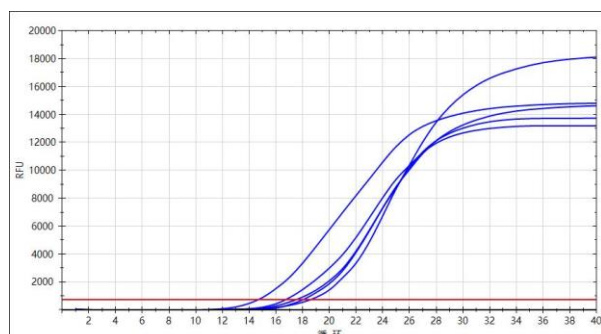
注意事项

1. cDNA 产物可在-20°C 储存或立即用于 PCR 反应。
2. 用于 PCR 反应的 cDNA 产物体积建议不超过 PCR 反应体积的 1/10。

产品性能

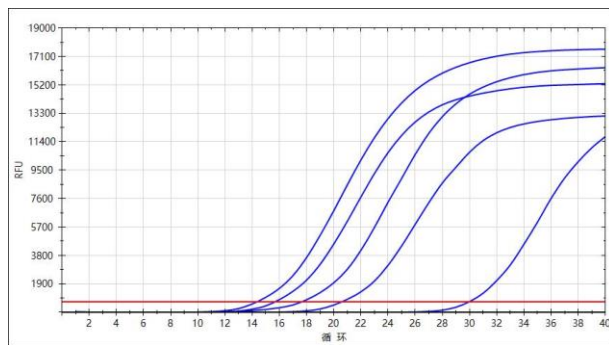
逆转录最适温度测试

在不同温度条件下，利用 M-MLV (H⁻) Reverse Transcriptase II 对 RNA 进行逆转录反应 45 min，并用 qPCR 检测逆转录效率。



反应温度条件	CT 值
40°C	18.51
42°C	17.45
50°C	16.67
60°C	18.01
70°C	14.62

图 1 在 40°C-70°C 温度测试区间范围的逆转录效率



反应温度条件	CT 值
72°C	14.33
74°C	15.65
76°C	17.62
78°C	20.58
80°C	29.97

图 2 在 72°C-80°C 温度测试区间范围的逆转录效率

结论：

1. M-MLV (H) Reverse Transcriptase II 在 72°C 逆转效果最佳；
2. M-MLV (H) Reverse Transcriptase II 在 40°C-78°C 的温度区间均能进行高效逆转录。