

M-MLV(H-) Reverse Transcriptase

R021-01



Version 5.1

Vazyme biotech co., ltd.

产品简介

野生型M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus)具有以下几种活性：依赖于RNA的DNA聚合酶活性；依赖于DNA的DNA聚合酶活性；RNase H活性。由于RNase H活性能够催化降解DNA/RNA杂合体中的RNA，因此在cDNA第一条链的合成反应中可能会降解模板RNA。M-MLV (H-) Reverse Transcriptase是通过定点突变得到的RNase H活性缺失的M-MLV突变体。与常见的通过删除 (deletion) 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。

产品组成

组 分	R021-01 10,000 U
5 × RT Buffer	500 µl
M-MLV (H-) Reverse Transcriptase (200 U/µl)	50 µl

储存条件

-20°C保存。

单位定义

以Poly (rA)·Oligo (dT)为模板/引物，在37°C，10分钟条件下，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的本酶和0.6 µg λ-Hind III在37°C下孵育16小时，DNA的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：200 U的本酶和0.6 µg Supercoiled pBR322 DNA在37°C下孵育4小时，DNA的电泳谱带不发生变化。

RNase残留检测：200 U的本酶和1 µg小鼠肝脏总RNA在37°C下孵育1小时，RNA电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌DNA残留检测：200 U本品中残留的核酸经*E.coli* 16s rDNA特异性的TaqMan qPCR检测，*E.coli*基因组残留低于10拷贝。

功能检测1：逆转录体系中加入200 U本酶，以1 µg Hela cell total RNA为模板，Oligo (dT)₁₈为引物，42°C反应45分钟。取1/10 cDNA产物进行PCR扩增DNCH基因。琼脂糖凝胶电泳，EB染色，可见有单一的3.2 kb条带。

应用实例

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
Oligo (dT) ₁₈ (50 µM)	
or Random hexamers (50 ng/µl)	1 µl
or Gene Specific Primers (2 µM)	
RNase inhibitor (40 U/µl)	1 µl
M-MLV (H-) Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl
模板RNA	Total RNA: 100 pg-5 µg Poly (A) ⁺ RNA: 10 pg-500 ng

按下列条件进行第一链合成反应:

使用 Oligo (dT)₁₈

42 °C	45 min*
70 °C	15 min

使用Random hexamers

25 °C	10 min
42 °C	45 min*
70 °C	15 min

使用Gene Specific Primers

42-50 °C	45 min*
70 °C	15 min

*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)。

70 °C 15 min为逆转录酶灭活步骤。cDNA产物可在-20 °C储存或立即用于PCR反应。用于PCR反应的cDNA产物体积建议不超过PCR反应体积的1/10。