

天
净
沙
系
列

CAT#:60905-10000
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

MMLV(RNase H-)逆转录酶

MMLV (RNase H-)Reverse Transcriptase

使用手册 V1.2

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点

该酶是突变型的 MMLV 逆转录 DNA 聚合酶，从表达 Moloney Murine Leukemia Virus (莫洛尼氏鼠白血病病毒) reverse transcriptase 基因(pol 基因)的 *E.coli* 细胞中分离纯化而得，由一个分子量为 76.1 KDa 的单亚基组成，可催化以单链 DNA、RNA 或 DNA: RNA 杂交链为模板的互补 DNA 链的聚合反应。跟野生型相比,它没有 RNase H 活性。

1. 延伸性能好，没有 RNase H 活性，可合成长达 12.5 Kb 的全长 cDNA
2. 本产品提供的 MMLV 酶含 RNase Inhibitor，用户不需要单独准备。
3. 本产品提供的含 dNTP 的 4×MMLV Buffer，用户不需要单独准备。
4. 最佳反应温度为 42℃，但在 50℃时仍有活性，70℃10 分钟能使其失活。
5. 能以 Cy3-, Cy5-, rhodamine-, aminoallyl-, fluorescein 等标记的 nucleotides 为底物。
6. 可用于 first strand cDNA 合成，second strand cDNA 合成，DNA labeling, RNA primer extension 等。
7. 与 PCR 兼容，RT 产物可以用于 PCR 和 Real-time PCR。
8. 能被金属螯合剂，无机磷酸，焦磷酸和多胺抑制。

规格及成分

成份	编号	塑料袋包装
MMLV 逆转录酶 (含 RI), 200U/μL	60905a	50 μL (黄盖)
4×RT Buffer (含 dNTP)	60905b	250 μL (白盖)
使用手册	60905sc	1 份

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年

使用方法

一：合成 PCR 用的 1st-strand cDNA

1. 按下表配制 RT 反应体系：

成分	加入量
自备 RNA 模板	
总 RNA	100-500 ng
或 poly(A) mRNA	10-500 ng
或专一的 RNA	0.01pg-500ng
注意：RNA 样品不能有基因组 DNA 污染。	
自备引物	
Oligo (dT) ₁₈ (0.5ug/μL)	1 μL
或随机引物(0.2ug/μL)	1 μL

或 RNA 模板专一性引物	15-20pmol
注意：随机引物于 RNA 模板的比例跟最后得到的 cDNA 的平均长度成反比。	
4×RT Buffer (含 dNTP)	5 μL
自备 RNase-free 水	补水到 19 μL

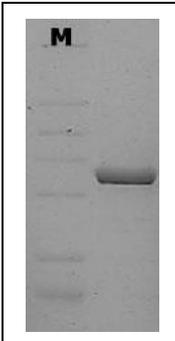
2. 70℃保温 5 分钟后立即冰浴。
3. 37℃保温 5 分钟。对富含二级结构的高 GC RNA 模板，可以改成 45℃保温 5 分钟。如果使用随机引物，则保温温度只能是 25℃ (5 分钟)。
4. 加入 1 μL (=200 U) MMLV 逆转录酶 (含 RI)，终体积为 20μL。
5. 42℃保温 60 分钟(但如果使用随机引物,需要先 25℃保温 10 分钟,然后再转移到 42℃保温 60 分钟)。
6. 70℃保温 10 分钟以终止反应，放置在冰上待用。合成的 cDNA 可以直接作为 PCR 模板使用，不需要纯化。

二：合成建文库用的 1st-strand cDNA

1. 按下表配制 RT 反应体系：

成分	加入量
RNA 模板	
或 poly(A) mRNA	1 ug
或专一的 RNA	0.5-1ug
注意：RNA 样品不能有基因组 DNA 污染。	
引物	
Oligo (dT) ₁₈ (0.5ug/μL)	1 μL
或随机引物(0.2ug/μL)	1 μL
或 RNA 模板专一性引物	100pmol
注意：随机引物于 RNA 模板的比例跟最后得到的 cDNA 的平均长度成反比。	
4×RT Buffer (含 dNTP)	5 μL
RNase-free 水	补水到 19 μL

2. 70℃保温 5 分钟后立即冰浴。
3. 37℃保温 5 分钟。对富含二级结构的高 GC RNA 模板，可以改成 45℃保温 5 分钟。如果使用随机引物，则保温温度只能是 25℃ (5

	<p>分钟)。</p> <p>4. 加入 1 μL (=200 U) MMLV 逆转录酶 (含 RI), 终体积为 20μL。</p> <p>5. 42$^{\circ}\text{C}$保温 60 分钟(但如果使用随机引物,需要先 25$^{\circ}\text{C}$保温 10 分钟,然后再转移到 42$^{\circ}\text{C}$保温 60 分钟)。</p> <p>6. 70$^{\circ}\text{C}$保温 10 分钟以终止反应,放置在冰上待用。合成的 cDNA 可以用于第二链 cDNA 的合成或放置在-20$^{\circ}\text{C}$。</p>
<p>相关资料</p>	<p>储存 Buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.1% (v/v) Triton X-100 和 50% (v/v) glycerol。</p> <p>反应 Buffer, 5X: 250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25$^{\circ}\text{C}$), 250 mM KCl, 20 mM MgCl_2, 50 mM DTT。</p> <p>活性定义</p> <p>以 poly(rA)为模板, 以 oligo(dT)₁₂₋₁₈ 为引物, 在 37$^{\circ}\text{C}$温度下, 在 10 分钟将 1 nmol 的 dTMP 掺入到多核苷酸中所需酶量为一个单位。酶反应条件为: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 6 mM MgCl_2, 10 mM DTT, 40 mM KCl, 0.5 mM dTTP, 0.4 MBq/mL [³H]-dTTP, 0.4 mM polyA•oligo(dT)₁₂₋₁₈。</p> <p>纯度</p> <p style="text-align: center;">SDS-PAGE 考马市亮蓝染色无杂带污染</p> <div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 10px;"> <p>图注: 10 μL 本产品 在 SDS-PAGE 中电泳后染色照片。纯度\gg 99%。M 表示蛋白质分子量对照。</p> </div> </div>
<p>关联产品</p>	<p>cDNA 第一链合成试剂盒、一管式 RT-PCR 试剂盒</p>