

M5 M-MuLV Reverse Transcriptase (RNase H-)使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 M-MuLV Reverse Transcriptase	10000U	MF009-01
M5 M-MuLV Reverse Transcriptase	5×10000U	MF009-05

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 24 个月。

【产品简介】

M5 M-MuLV Reverse Transcriptase (RNase H-) 是利用基因工程技术，对 M-MuLV 反转录酶的基因进行定点突变改造后，通过原核重组表达、柱层析纯化得到的反转录酶，适用于常规反转录反应、RT-PCR 扩增、实时定量 RT-PCR 等实验的第一链 cDNA 合成。经过多重定点突变的 M-MuLV 反转录酶不仅去除了 RNase H 酶活性，而且增加了该酶与模板-底物的亲和力，合成的 cDNA 产量更多、更长(可以高效合成长达 13kb 的全长第一链 cDNA)。此外，该酶对于高温有更强的耐受性(在 50°C 仍具有活性)，可以使用较高的反转录反应温度，因此更好地克服了因模板 RNA 的二级结构而引起的反转录困难现象。

【单位定义】

活性单位的反转录酶定义为在 42°C、10 分钟条件下，使 1 nmol 的脱氧核糖核酸掺入酸性沉淀物质所需的酶量。

【产品组分】

M5 M-MuLV Reverse Transcriptase (RNase H-) (200U/μl) 50 μl
5× M5 M-MuLV RT Buffer* 500 μl
(5× M5 M-MuLV RT Buffer 成分：250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT)

【适用范围】

合成 cDNA 第一链，用于 RT-PCR 和实时 RT-qPCR，用于克隆和表达研究。
制备带标记的 cDNA 探针，用于 microarray 研究；DNA 标记和引物延伸法分析 RNA。

【使用方法】

A. <注意事项>

1. 实验过程中请注意 **避免 RNase 污染**。
2. RNA 模板的完整性对 cDNA 合成效率起着决定性作用，因此请选择可靠的 RNA 提取/纯化方法。建议使用聚合美 M5 Total RNA Extraction Reagent (货号 MF034-01) 制备高质量的 RNA 模板，并设置反转录反应阳性对照。
3. 由于所有的 RNA 提取方法都不能完全去除基因组 DNA，所以应根据后续实验的需求，选择是否需要反转录反应前去除残留基因组 DNA。RNase-free DNase I 处理的具体方法见本说明书后面。
4. M5 M-MuLV Reverse Transcriptase (RNase H-) 以 RNA 为模板获得全长的第一链 cDNA，其起始位点由所用引物所决定：
 - 1) 随机引物(Random Primer)在 RNA 模板上没有特异性结合位点，所有 RNA 都可以做为第一链 cDNA 合成的模板；
 - 2) Oligo dT Primer 只能以 poly(A) mRNA 作为 cDNA 合成的模板；
 - 3) 采用序列特异性引物 (GSP) 以其结合位点为起始位点。
5. M5 M-MuLV Reverse Transcriptase (RNase H-) 合成的第一链 cDNA 产物可直接加入 PCR 反应混合物中进行扩增，但加入体积不应超过 PCR 反应总体系的 10%，否则影响目的片段的产量。PCR 扩增使用的耐热 DNA 聚合酶和热循环条件需要根据目的片段的大小、GC 含量、引物特性、以及对保真度的要求等进行选择。
6. 第一链 cDNA 合成产物经过处理后可作为第二链合成的模板，合成含各种标记的 cDNA，作为杂交实验的探针。
7. RNA 应置于-70°C 以下保存，cDNA 合成产物应置于-20°C 保存。

B. <标准操作流程> (适于复杂模板或对扩增产量要求较高的实验)

1. 在 DNase/RNase-free 离心管中依次加入下列成分:

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1) RNA 模板: | ≤8 μl (总 RNA 1~5 μg; poly(A) mRNA 0.1~0.5 μg) |
| 2) 引物: | 1 μl (Oligo dT 引物/Random 引物 50 μM; 引物/序列特异性引物 50 μM) |
| 3) 10 mM dNTP Mix: | 1 μl |
| 4) DEPC-ddH ₂ O 补足至 | 14.5 μl |

2. 混匀, 短暂离心, 65°C 加热 5 分钟, 打开 RNA 的二级结构;

3. 立即置于冰上至少 1 分钟, 避免 RNA 的二级结构重新形成;

4. 向管中加入:

- | | |
|------------------------|--------|
| 5× M5 M-MuLV RT Buffer | 4 μl |
| RNase Inhibitor | 0.5 μl |

5. 轻轻混匀, 短暂离心; 如果采用 Oligo dT 或序列特异性引物, 42°C 温育 2 分钟; 如果采用随机引物, 25°C 温育 2 分钟;

6. 加入 1 μl M5 M-MuLV Reverse Transcriptase (RNase H-), 轻轻混匀; 如果采用随机引物, 25°C 温育 10 分钟;

7. 42°C 温浴 50 分钟;

8. 85°C 加热 5 分钟使酶失活;

9. 置于冰上进行后续实验或冷冻保存。

C. <简化操作流程> (不适于复杂模板或对扩增产量要求较高的实验)

1. 在 DNase/RNase-free 离心管中加入下列成分:

- | | |
|---------------------------------|---|
| 5× M5 M-MuLV RT Buffer | 4 μl |
| RNase Inhibitor | 0.5 μl |
| 10 mM dNTP Mix | 1 μl |
| RNA 模板 | ≤8 μl (1~5 μg 总 RNA 或 0.1~0.5 μg poly(A) mRNA) |
| 引物 | 1 μl (50 μM Oligo dT 引物/ Random 引物/20 μM 序列特异性引物) |
| M5 M-MuLV Reverse Transcriptase | 1 μl |
| DEPC-ddH ₂ O | 补足至 20 μl |

2. 轻轻混匀, 短暂离心; 42°C 温浴 50 分钟;

3. 85°C 加热 5 分钟使酶失活; 马上置于冰上进行后续实验或冷冻保存。

【补充说明】

以下流程为选做步骤, 请根据实验情况酌情选择

1. RNase-free DNase I 处理 RNA 模板的方法:

1) 在 DNase, RNase-free 离心管中加入下列试剂:

- | | |
|-------------------------|-----------|
| RNA | 2-5 μg |
| 10× DNase I buffer | 1 μl |
| DNase I (2 U/μl) | 0.5 μl |
| RNase Inhibitor | 0.25 μl |
| DEPC-ddH ₂ O | 补足至 10 μl |

2) 混匀, 短暂离心, 37°C 放置 30 分钟;

3) 加入 1 μl 50 mM EDTA, 65°C 放置 15 分钟使 DNase I 失活; 或者直接使用酚/氯仿抽提去除 DNase I;

4) 为避免干扰反转录体系, RNA 加入量最好不超过反转录体系的 1/5, 如果 RNA 浓度过低, 建议沉淀浓缩后使用。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。