

M-MLV 逆转录酶

产品组分

R1041	规格	数量
M-MLV	200 U/μl	5000 U
5xfirst-strand buffer	5 x	100 μl

R1042	规格	数量
M-MLV	200 U/μl	10000U
5xfirst-strand buffer	5 x	200 μl

- R1041 可进行 25 次逆转录反应 (20 μl 标准 PCR 反应体系, 每次使用 M-MLV 1 μl)。

M-MLV 储存液

20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 200 mM NaCl
 0.1 mM EDTA
 1 mM DTT
 0.01% NP-40
 50% glycerol

5xfirst-strand buffer 成分

250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C)
 375 mM KCl
 15 mM MgCl₂
 50 mM DTT

产品说明

东盛生物出产的 M-MLV 是由一个 71kD 的单亚基组成的重组型 DNA 逆转录聚合酶。可以催化以 RNA 或 DNA:RNA 杂交链为模板的互补 DNA 的聚合反应。本酶经修饰 RNaseH 活性比普通的逆转录酶要弱很多,因此在合成第一链 cDNA 的过程中,可保证 RNA 的降解程度较低,从而使得率提高。

逆转录酶活性检测

使用[32P]dCTP 作为标记,200 U 的 M-MLV 以 1μg、1.2 kb 的 RNA 为模板进行逆转录反应,最低可得到 120 ng 的 cDNA,所得 cDNA 长度 > 全长的 90%。

核酸外切酶活性检测

混合 50 ng 的标记 DNA 或 RNA 与 200 U M-MLV 在 1x 反应缓冲液体系中,37°C 温浴 1 h,检测 DNA 和 RNA 降解都不到总量的 1%。

核酸内切酶活性检测

混合 1μg I 型超螺旋质粒 DNA 与 500 U M-MLV 在 1x 反应缓冲液体系中,37°C 温浴 1 h,琼脂糖电泳检测,无明显的剪切。

保存条件

-20°C 保存,避免反复冻融。

适用范围

第一链 cDNA 合成
 cDNA 文库构建
 一步法 RT-PCR
 引物延伸
 3' 和 5'RACE

注意事项

- 成功的 cDNA 合成来自高质量的 RNA。高质量的 RNA 至少应保证全长并且不含逆转录酶的抑制剂,如 EDTA 或 SDS。用于 cDNA 合成反应的溶液试剂尽可能用 DEPC 进行处理,并在高压灭菌后使用。有些试剂不能高压灭菌时,首先用经为了增加贮存 RNA 样品的稳定性,可以将 RNA 溶解在去离子的甲酰胺中,存于-70°C。用于保存 RNA 的甲酰胺一定不能含有降解 RNA 的杂物。来源于胰脏的 RNA 至少可以在甲酰胺中保存一年。当准备使用 RNA 时,可以使用下列方法沉淀 RNA:加入 NaCl 至 0.2 M 及 4 倍体积的乙醇,室温放置 3-5 min,10,000 rpm 离心 5 min。
- 在逆转录反应中经常加入 RNase 抑制剂以增加 cDNA 合成的长度和产量。RNase 抑制剂要在第一链合成反应中,在缓冲液和还原剂(如 DTT)存在的条件下加入,因为 cDNA 合成前的过程会使抑制剂变性,从而释放结合的可以降解 RNA 的 RNase。蛋白 RNase 抑制剂仅防止 RNase A, B, C 对 RNA 的降解,并不能防止皮肤上的 RNase,因此尽管使用了这些抑制剂,也要小心不要从手指上引入 RNase。
- 较高的保温温度有助于 RNA 二级结构的打开,增加了反应的产量。
- 用于 cDNA 合成反应的溶液试剂尽可能用 DEPC 进行处理,并在高压灭菌后使用。有些试剂不能高压灭菌时,首先用经过灭菌的器具、水等配制溶液后,再将溶液进行过滤除菌处理。

- 使用简单的 RNA 纯化方法即可获得满足于 RT-PCR 反应的 RNA，但为了保证实验的成功率，建议使用 GTC 法（异硫氰酸胍法）制备的高纯度 RNA。
- 为防止 RNA 降解，应尽量避免反复冻融，有条件的实验室最好保存于-70℃。
- 最佳的 PCR 反应条件，因 PCR 扩增仪的不同而不同，所以在您的样品之前最好先试做一下 control 反应，以确定最佳的 PCR 反应条件。
- cDNA 产物应置于-20℃保存。
- 当以 cDNA 为模板进行 PCR 之前，使用 RNaseH 处理 cDNA，可以提高 PCR 反应的灵敏度。

操作步骤-----

- 1 在冰浴的无菌离心管中配制下列混合物
1-5 µg RNA
1 µl Oligo(dT)₁₅ 或 Random primer,
补 RNase-free ddH₂O 至 13.4 µl ;
- 2 进行变性退火反应
70℃ 温浴 5 min,
简短离心后冰浴 5 min;
- 3 在上述离心管中配制反转录反应液
4 µl \times first -strand buffer ,
1 µl dNTPs (10 mM each) ,
0.6 µl RNasin ,
1 µl M-MLV;
- 4 按下列条件进行反转录反应
42℃ 温浴 60 min (随即引物 37℃ 温浴 60 min) ;
- 5 终止反应
70℃ 温浴 5 min 终止反应，置冰上进行后续实验或-20℃ 保存。
- 6 用 RNase-free ddH₂O 将反应体系稀释到 50 µl ，取 2-5 µl 进行 PCR 扩增反应。

Q&A-----

问：反转录怎样选择使用哪种引物？

答：反转录引物的选择，应结合实验的具体情况，选择以下三种引物，即：Random 6 mers、Oligo dT Primer 或特异性下游引物。对没有发夹结构的短链 mRNA，上述三种引物都可以使用；一般情况下的反转录引物的选择请参照以下说明。

Random primer：适用于长的或具有 Hairpin 构造的 RNA。包括 rRNA、mRNA、tRNA 等在内的所有 RNA 的反转录反应都可使用本引物。

Oligo(dT)₁₅primer：适用于具有 Poly (A)+ Tail 的 RNA。（注意：原核生物的 RNA、真核生物的 rRNA、tRNA 以及某些种类的真核生物的 mRNA 等不具有 Poly (A)+ Tail）。

特异性下游引物（PCR 时的下游引物）：必须与模板序列互补，需了解 Target 序列。

问：反转录引物的用量怎样？

答：普通情况下 Oligo(dT)₁₅ 和 Random primer 均用 1 µl 2 kb 以上的长片段 cDNA 合成时,Random primer 的使用量为 0.4 µl (20pmol); Real Time PCR 反应时, Random primer 引物使用 2 µl (100 pmol) 可以得到较好的实验结果; 也可以使用 Gene Specific Primer, 此时引物终浓度为 0.1µl。

问：Random primer 的使用与 Oligo(dT)₁₅primer 有何异同？

答：以 Random primer 反转录时，应先 25℃ 反应 10 min 再 42℃ 反应 1 h。

问：试剂盒及反转录用的 RNA 应如何保存？

答：试剂盒及 cDNA 产物应在-20℃ 保存，RNA 应避免反复冻融，使 RNA 在冰浴中保持融化状态。