

版本号: ER121221

TIANScript M-MLV

目录号: ER104

产品内容

产品组成	ER104-03 25 rxn	ER104-04 100 rxn
TIANScript M-MLV (200 U/μl)	25 μl	100 μl
5× First-Strand Buffer	150 μl	500 μl

储存条件

-20°C 可保存1年。

产品简介

TIANScript M-MLV是由一个71 kDa的单亚基组成的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的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, RNA的降解程度降低, 从而使得率提高。该酶浓度为200 U/ μ l。

产品特点

在以较长的mRNA(>5kb)为模板的逆转录反应占优势。

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

产品来源

重组E.coli菌株,含有从莫洛尼氏鼠中克隆的莫洛尼氏鼠白血病病毒逆转录酶基因。

活性单位

1单位活力定义为在37°C、10 min内, 以polyA.poly(dT)₁₂₋₁₈作为模板-引物, 将1 nm dNTPs掺入到酸不溶物质所需的酶量。

操作步骤

用TIANScript M-MLV合成第一链cDNA

20 μ l反应体系可用于1-5 μ g总RNA或50-500 ng mRNA的逆转录。

1. 请将以下成分加到一个无核酸酶的离心管中:

2 μ l oligo (dT)₁₂₋₁₈(10 μ M)或2 μ l随机引物(10 μ M)或2 pmol 基因特异引物;

1-5 μ g总RNA或50-500 ng mRNA;

2 μ l (10 mM total) dNTPs(中性pH值);

补灭菌蒸馏水至15 μ l。

2. 70°C 加热5 min后迅速在冰上冷却2 min。简短离心收集反应液后加入4 μ l 5×First-Strand Buffer (含有DTT)。

可选步骤: 如果起始RNA少于50 ng时, 应加0.5-1 μ l RNasin (40 U/ μ l)。

3. 加入1 μ l (200U) TIANScript M-MLV并轻轻用移液器混匀。如果用随机引物, 请将离心管置25°C 温浴10 min。

4. 42°C 温浴50 min。

5. 95°C 加热5 min终止反应, 置冰上进行后续实验或冷冻保存。

如果需要用RNase H处理, 进行步骤6。否则, 进行步骤7。

6. 加RNase H 1 μ l (2 U), 37°C 温浴20 min以降解RNA。然后95°C 加热5 min使酶失活。

7. 用RNase-Free ddH₂O将反应体系稀释到50 μ l, 取2-5 μ l进行PCR扩增反应。

PCR反应

应吸取10%的第一链反应液(2 μ l)进行PCR反应；即使加入更多量的第一链反应液也不能增加其扩增的产物量，反而可能会抑制正常的PCR反应。

1. 请将以下成分加入到PCR管中并使其终反应体积为50 μ l:

组成成分	体积
10 \times PCR Buffer	5 μ l
Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.4 μ l
10 mM dNTP mix	1 μ l
50 mM MgCl ₂	1.5 μ l
扩增引物1 (10 μ M)	1 μ l
扩增引物2 (10 μ M)	1 μ l
cDNA (第一链反应)	2 μ l
ddH ₂ O	38.1 μ l
总体积	50 μ l

注：为了得到最好结果，MgCl₂最适浓度应依不同的模板-引物对而定。

- 94 $^{\circ}$ C 加热变性2 min。
 - 设置15到40个PCR循环。退火与延伸条件依引物和模板而定。
-