



M-MLV 4 Two-Step RT-PCR Kit

产品信息:

组成	MT413-01	规格
M-MLV 4 (200U/μl)	10000U	RT体系/PCR体系 20μl×50次/50μl×80次
5×RT Mix	500μl	
Random Primer(N9)(0.1μg/μl)	60μl	
Anchored Oligo(dT) ₂₀ Primer (0.5μg/μl)	60μl	
2×Xerox PCR MasterMix(含染料)	1ml×2	
H ₂ O(RNase free)	1ml×2	

存储条件: -20℃保存两年。

制品说明:

M-MLV 4 是通过基因重组技术改造,在大肠杆菌中表达纯化得到的高温反转录酶,去除RNaseH活性。可在42℃-65℃条件下合成第一链cDNA,具有灵敏度高,特异性高,热稳定性高和半衰期长的特点。聚合能力强,具有更强的延伸能力,可用于较长的cDNA合成以及高比例的全长cDNA文库的构建。PCR使用2× Xerox PCR MasterMix扩增,扩增产物为平端可直接连接到本公司的TOPO系列载体中。本试剂盒含有从RNA到cDNA,以及PCR扩增cDNA的全部试剂。

产品特点:

1. Anchored Oligo(dT)₂₀设计独特能锚定mRNA Poly(A)⁺的5'端区域,退火位点锚定,特异性高,保证cDNA合成效率和成功率
2. 可用Random Primer (N9)或基因特异引物(GSP)合成第一链cDNA;
3. 合成片段≤15kb;
4. 适用范围:
 - cDNA 文库构建、引物延伸、3'和5' RACE.
 - 高拷贝、低拷贝基因检测。
 - 高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板。

操作步骤:

为方便保存和运输本产品所配Random Primer(N9)和Anchored Oligo(dT)₂₀均为干粉,使用前需用60μl H₂O(RNase free)溶解,具体体积参见产品标签。

第一链cDNA合成。(以20 μl反应体系为例)

1.加入

Components	Volume
Total RNA/mRNA	50 ng-5μg/5-500ng
Anchored Oligo(dT) ₂₀ (0.5μg /μl)	1μl
or Random Primer(N9)(0.1μg/μl)	1μl
or GSP	2pmol
5× RT Mix	4μl
M-MLV 4	1μl
H ₂ O(RNase free) to final volume	20μl

2. 轻轻混匀

如用Anchored Oligo(dT)₂₀或基因特异引物(GSP), 50℃孵育30min。(注:根据具体实验情况,可50℃孵育时间为5min-30min)

如用Random Primer(N9), 25℃孵育10 min, 50℃孵育30 min。

对高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板,可选择55℃孵育30min。

3. 85℃加热15 min失活M-MLV 4.

PCR

1.PCR体系(以50 μ l反应体系为例)

建议取1/10-1/5 体积(2-4 μ l)的反转录产物作为PCR模板。

Components	Volume	Final Concentration
cDNA	2 μ l	as required
Forward Primer (10 μ M)	1 μ l	0.2 μ M each
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.2 μ M each
2 \times Xerox PCR MasterMix	25 μ l	1 \times
ddH ₂ O to final volume	50 μ l	Not applicable

2.PCR 循环

98 $^{\circ}$ C 2-5min

98 $^{\circ}$ C 30sec

50-60 $^{\circ}$ C 30sec

30-40 cycles

72 $^{\circ}$ C 2-4kb/min

72 $^{\circ}$ C 5-10min

注意事项:

- 1.避免RNase污染。
- 2.为保证反转录成功建议使用高质量的RNA样品。

BM230915