



M-MLV 4 First-Strand cDNA Synthesis Kit

产品信息:

组成	MT403-01 (50次)
M-MLV 4 (200U/ μ l)	10000U
5 $\times$ RT Mix	500 μ l
Random Primer(N9)(0.1 μ g/ μ l)	60 μ l
Anchored Oligo(dT)18VNPrimer(0.5 μ g/ μ l)	60 μ l
H ₂ O(RNase free)	1ml

存储条件: -20℃ 保存

制品说明: 本产品以 RNA 为模板, 用高效合成第一链 cDNA, 操作简单。

产品特点:

- 1.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, 可用于较长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建;
- 2.Anchored Oligo(dT)18VN 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;
- 3.可用 Random Primer (N9) 或基因特异引物 (GSP) 合成第一链 cDNA;
- 4.合成片段 $\leq$ 15kb;
- 5.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)18VN 均为干粉, 使用前需用 60ul H₂O(RNase free)溶解, 具体体积参见产品标签。

第一链cDNA合成。(以20 μ l反应体系为例)

1.加入

Components	Volume
Total RNA/mRNA	50 ng-5 μ g/5-500ng
Anchored Oligo(dT)18VN(0.5 μ g / μ l)	1 μ l
or Random Primer(N9)(0.1 μ g/ μ l)	1 μ l
or GSP	2pmol
5 $\times$ RT Mix	4 μ l
M-MLV 4	1 μ l
H ₂ O(RNase free) to final volume	20 μ l

2.轻轻混匀

如用Anchored Oligo(dT)18VN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50μl反应体系为例)

建议取1/10-1/5 体积(2-4μl)的反转录产物作为PCR模板。

Components	Volume
cDNA	2μl
Forward Primer (10μM)	1μl
Reverse Primer (10μM)	1μl
10× Taq Buffer(with Mg^{2+})	5μl
10 mM dNTPs	1μl
Taq DNA Polymerase	0.5-1μl
ddH ₂ O to final volume	50μl

2.PCR 循环

94℃ 2-5min

94℃ 30sec

50-60℃ 30sec

72℃ 1-2kb/min

72℃ 5-10min

30-40 cycles

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。
- 3.引物使用前请用60ul H₂O(RNase free)稀释。

BM190221