M-MLV 4 First-Strand cDNA Synthesis Kit with gDNA Eraser

产品信息：

组成	MT404-01（50次）
M-MLV 4（200U/μl）	10000U
5×RT Mix	500μl
Random Primer(N9)(0.1μg/μl)	60μl
Anchored Oligo(dT)$_{18}$VN Primer(0.5μg/μl)	60μl
H_2O(RNase free)	1ml
dsDNase	50μl
10 × dsDNase Buffer	100μl

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。并且含有 dsDNase，可以有效去除 RNA 样本中的基因组。

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. dsDNase 是一种核酸内切酶，可以裂解 DNA 中的磷酸二酯键，生成具有 5 ' -磷酸和 3 ' -羟基末端的寡核苷酸。对双链 DNA 的高度特异性活性确保 RNA 和单链 DNA(如 cDNA 和引物)不被切割。dsDNase 通过适度热处理(55°C)很容易失活。这些特性使 dsDNase 成为逆转录前 gDNA 消除的极佳选择。

3.Anchored Oligo(dT)$_{18}$VN 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；

4.可用 Random Primer（N9）或基因特异引物（GSP）合成第一链 cDNA；

5.合成片段≤15kb；

6.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：

1. 去除基因组反应（可在冰上进行）。

为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先按反应数 +2 的量配制 Master Mix，然后再分装到每个反应管中，最后加入 RNA 样品。

Components	Volume
Total RNA/mRNA	50 ng-5μg/5-500ng
10 × dsDNase Buffer	1μl
dsDNase	1μl
H_2O(RNase free)	to final volume 10μl

轻轻混匀，瞬时离心。

37℃，2 min。

4℃

2.反转录反应（可在冰上进行）。

去除基因组后可进行 cDNA 合成，RT-PCR，RT-qPCR 等，将上述步骤 1 的 10ul 反应液加入到反转录体系中。

为方便保存和运输本产品所配 Random Primer(N9)和 Anchored Oligo(dT)$_{18}$VN 均为干粉，使用前需用 60μl H_2O(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
步骤 1 反应液	10μl
5× RT Mix	4μl
Anchored Oligo(dT)$_{18}$VN(0.5μg /μl)	1μl
or Random Primer(N$_9$)(0.1μg/μl)	1μl
or GSP	2pmol
M-MLV 4	1μl
H_2O(RNase free)	to final volume 20μl

2.**轻轻混匀**

如用Anchored Oligo(dT)$_{18}$VN或基因特异引物(GSP)，42-50℃孵育15-30min。(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，42-50℃孵育15-30 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5-15 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_2O to final volume	50μl

2.PCR 循环

94℃ 2-5min

94℃ 30sec

50-60℃ 30sec

72℃ 1-2kb/min

30-40 cycles

72℃ 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。

3.引物使用前请用60μl H_2O(RNase free)稀释。