

M-MLV 逆转录酶

货号/规格: R1041/5,000U, R1042/10,000U

产品说明

M-MLV 逆转录酶是由一个 71 kD 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 RNase H 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。

产品组分

组分	R1041	R1042
M-MLV (200U/μl)	25 μl	50 μl
5× first-strand buffer	100 μl	200 μl

R1041 可进行 25 次逆转录反应, R1042 可进行 50 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 储存液成分

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

5x first-strand buffer 成分

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

保存条件

-20°C 保存, 避免反复冻融。

质量检测

逆转录酶活性检测

使用 [³²P]dCTP 作为标记, 200 U 的 M-MLV 以 1 μg、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 1×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 1 μg I 型超螺旋质粒 DNA 与 500 U M-MLV 在 1×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。

适用范围

第一链 cDNA 合成; cDNA 文库构建; 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 至少应保证全长的完整性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。有些试剂不能用高压灭菌处理时, 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。
- 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 的杂质。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 同时加入 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 (RNasin) 以增加 cDNA 合成的长度和产量。在第一链合成反应中, RNase 抑制剂在缓冲液和还原剂 (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, 从而释放出 RNase。但是 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 RNase 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, 增加反应的产量。
- 使用简单的 RNA 纯化方法即可获得满足 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, 最好保存于 -70°C。
- 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°C 保存。
- 当以 cDNA 为模板进行 PCR 之前, 使用 RNase H 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

RNA	1-5 µg
Oligo (dT) ₁₅ 或 Random primer	1 µl
RNase-free ddH ₂ O	To 13.4 µl

2 进行变性退火反应

70°C 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

上述反应液	13.4 µl
5× first-strand buffer	4 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
RNasin	0.6 µl
M-MLV	1 µl
Total	20 µl

4 按下列条件进行反转录反应

Oligo (dT)₁₅ : 42°C 温浴 60 min;

Random primer: 37°C 温浴 60 min。

5 终止反应

70°C 温浴 5 min 终止反应, 置冰上进行后续实验或 -20°C 保存。

6 用 RNase-free ddH₂O 将反应体系稀释到 50µl, 取 2-5µl 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 primer、Oligo (dT) primer 或特异性引物。对于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) primer : 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)。

特异性引物: 最特异的引发方法是用含目标 RNA 互补序列的寡核苷酸作为引物, 第一链的合成可与 mRNA 3'端最靠近的配对引物起始。用此类引物近产生所需要的 cDNA, 导致更为特异的 PCR 扩增。

● 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 0.1 µM。

● 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°C 保存, RNA 应避免反复冻融, 使 RNA 在冰浴中保持融化状态。

本品仅供科学研究使用。