



M-MLV III Two-Step RT-PCR Kit

产品信息:

组成	MT412-01	规格
M-MLV III (200U/μl)	10000U	RT体系/PCR体系 20μl×50次/50μl×80次
5×RT Mix	500μl×2	
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℃保存一年。

制品说明:

M-MLV III 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40℃-55℃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。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. 适用于高拷贝基因检测。

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 RNase free H₂O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 III	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), 42℃孵育50min。

如用Random Primer(N9), 25℃孵育10 min, 42℃孵育50 min。

如果扩不出, 可能存在RNA二级结构, 建议提高温度从新扩增。

3. 85℃加热15 min失活M-MLV III.

RT-PCR

建议取1/10-1/5 体积(2-4 μ l)的反转录产物作为PCR模板。

建议PCR条件(以50 μ l反应体系为例)

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

PCR 循环

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

98 $^{\circ}$ C 30sec

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

72 $^{\circ}$ C 1-2kb/min

72 $^{\circ}$ C 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。

BM20210602