



M-MLV GIII Reverse Transcriptase

货号: M5124

储存条件: -20℃

产品组成

组分规格	规格
M-MLVGIII Reverse Transcriptase(200U/ul)	50ul
5 × M-MLV First Strand Buffer	500ul
0.1M DTT	100ul

产品简介

M-MLV GIII Reverse Transcriptase 是通过基因修饰和重组技术获得的第三代 M-MLV 逆转录酶。该酶相对于野生型 M-MLV 逆转录酶去除了 RNase H 活性,并大幅提高了热稳定性(最适反应温度为50℃),从而大大提高了合成第一链 cDNA 时的特异性和长度(最长可达12 kb),增强了对 RNA 复杂二级结构的耐受性。

酶活单位定义: 37℃条件下,以 Poly(A)-Oligo(dT)为模板/引物,在 10min 内掺入 1nmol 的 [³H] dTTP 所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

质量控制

宿主原性 DNA 检测

无宿主 DNA 污染。

核酸内切酶残留检测

将酶液与超螺旋质粒 DNA 在 37℃温育 4h,通过 DNA 电泳检测质粒无变化。

核酸外切酶残留检测

将酶液与双链 DNA 底物在 37℃温育 16h,通过 DNA

电泳检测双链 DNA 底物无变化。

使用方法

第一链 cDNA 合成步骤



1. 于冰上配制如下反应体系:

试剂	使用量
引物	x μl
Oligo(dT)20	终浓度 2.5 μM
或随机引物	终浓度 2.5 ng/μl
或基因特异性引物	终浓度 0.25 μM
模板 RNA ^a	50 ng~1 μg/20 μl
5× M-MLV First Strand Buffer	4 μl
0.1 M DTT	1 μl
M-MLV GIII Reverse Transcriptase (200 U/μl)	1 μl
dNTP Mix (10 mM Each)	1 μl
(可选) RNase Inhibitor (40 U/μl)	1 μl
Nuclease-Free Water	To 20 μl

a. 推荐使用试剂盒提取的已去除基因组 DNA 污染的高质量 RNA 作为模板。

2. 轻柔吸打混匀后, 瞬离;

3. 若使用 Oligo(dT)20 或基因特异性引物, 50℃温育 30 min; 若使用随机引物, 先 25℃温育 5 min, 之后 50℃温育 30 min;

注: 若目的 cDNA 小于 3 kb, 温育时间可缩短为 15 min。

4. 反应结束后, 85℃温育 5 min 以终止反应;

5. 将获得的 cDNA 溶液置于冰上, 用于后续实验。

注: cDNA 溶液置于-20℃可保存半年; 置于-80℃可长期储存。

