

M-MLV GIV Reverse Transcriptase

货号: M5125

存储条件: -20°C, 有效期 2 年

产品组分

组分	规格
M-MLV GIV Reverse Transcriptase (200 U/μl)	50ul
5× M-MLV Buffer	500ul
0.1M DTT	100ul

产品说明

M-MLV GIV Reverse Transcriptase 是通过基因修饰和重组技术获得的第四代 M-MLV 逆转录酶。该酶相对于野生型 M-MLV 逆转录酶去除了 RNaseH 活性, 并大幅提高了热稳定性(最适反应温度为 55°C), 70°C 仍有 50%活性, 相较于前代酶进一步提高了对复杂二级结构的耐受性。该酶具有更快的反应速度, 只需 10 分钟即可完成逆转录反应过程。该酶与模板亲和力更强, 在低模板量或低拷贝模板时表现更佳。与此同时, 该酶的全长 cDNA 合成能力也得到提升, 最长可获得 20kb 的全长 cDNA。

酶活定义

37°C 条件下, 以 Poly(A)-Oligo(dT)为模板/引物, 在 10min 内, 掺入 1nmol 的[2H]dTTP 所需要的酶量定义为 1 个活性单位(U)。

质量控制

蛋白纯度

经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 蛋白纯度不低于 95%。

核酸内切酶残留检测

将酶液与超螺旋质粒 DNA 在 37°C 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°C 温育 16h, 通过 DNA 电泳检测双链 DNA 底物无变化。

宿主 DNA 残留检测

采用中国药典 2020 版四部通则 3407 外源性 DNA 残留量测定法第三法定量 PCR 法, 本品中大肠杆菌宿主细胞 DNA 残留量低于 1 拷贝/200U。

使用方式

1、第一链 cDNA 合成

试剂	使用量
引物	X ul
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~2ug/20ul
5× M-MLV Buffer	4 ul
0.1 M DTT	1 ul
M-MLV GIV Reverse Transcriptase (200 U/μl)	1 ul
dNTP Mix (10 mM Each)	1 ul
(可选) RNase Inhibitor (40 U/μl)	1 ul
Nuclease-Free Water	Up to 20ul

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, 55°C 温育 10 min; 若使用随机引物, 先 25°C 温育 5min, 之后 55°C 温育 10min;

注: 若目的 cDNA 小于 3kb, 温育时间可缩短为 5min。对于高 GC 含量模板或者复杂模板, 可将逆转录温度提高到 60°C~65°C。

4. 反应结束后, 85°C 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°C 可保存半年; 置于-80°C 可长期储存。

