

## THERMO M-MuLV (RNase H<sup>-</sup>) THERMO 反转录酶

### 包装量:

目录编号	包装单位	组成	154301	154302
154301	5000U	THERMO H <sup>-</sup> RTase (200U/ μl)	5000U	10000U
154302	10000U	5×RT Buffer	250μl	500μl

### 产品组成、储存、浓度:

储存: -20 °C 保存。浓度: 200 units/μl

**制品说明:** 本制品使用通过基因重组技术克隆表达的点突变型 RNase H 活性缺失的 M-MuLV 反转录酶 THERMO H<sup>-</sup> RTase。同时经过多点突变, 提高了反转录温度耐受性, 可以在 45-55°C 进行反转录 (更高温度反转时活性会部分减低)。野生型的 M-MuLV 包含的 RNase H 活性能够催化降解 DNA/RNA 杂合体中的 RNA, 因此在 cDNA 第一条链的合成反应中可能会降解 RNA/DNA 杂合体中的模板 RNA。本酶 M-MuLV(RNase H<sup>-</sup>) 的 RNase H 活性缺失, 与 M-MuLV 相比, 具有更强的延伸能力和稳定性, 可用于较长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建等。同时更高的反转录温度大大的提高了 GC 含量高, 二级结构丰富的 RNA 模板的反转录效率。

**适用范围:** 第一链cDNA合成。可用于低拷贝基因的检测。

**特点:** 合成cDNA片段长度最高可达12 kb。

**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-5 μg/5-500 ng
Oligo(dT) <sub>18</sub> (0.5 μg /μl)or	1 μl
Random Primer(0.1 μg/μl) or	1 μl
GSP(Gene Specific Primer)	2 pmol
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
5× RT Buffer	4 μl
RNase Inhibitor(40 units/μl)	0.5 μl
THERMO H <sup>-</sup> RTase	0.8-1μl (见注意事项 4)
RNase free H <sub>2</sub> O to final volume	20 μl

## 2. 轻轻混匀

如用Oligo(dT)<sub>18</sub>或基因特异引物(GSP), 50°C 孵育50min。

如用Oligo(dT)<sub>18</sub>在55°C 反转录, 首先应该42°C 孵育5 min, 然后55°C 孵育50min。

如用Random Primer, 25°C 孵育10 min, 50°C 孵育50 min。

## 3. 65°C 加热15 min失活THERMO H<sup>+</sup> RTase。

注意: GC含量高(>50%)或者二级结构复杂模板, 可以提高反转录温度至55°C左右。

## RT-PCR

建议取1/10-1/5 体积(2-4 μl)的反转录产物作为PCR模板。

### 建议PCR条件(以50 μl反应体系为例)

Components	Volume	Final Concentration
cDNA Template	2 μl	as required
Forward Primer (10 μM)	1 μl	0.2 μM each
Reverse Primer (10 μM)	1 μl	0.2 μM each
10×Taq Buffer (含Mg <sup>2+</sup> )	5 μl	1×
2.5 mM dNTPs	4 μl	0.2 mM
Taq DNA Polymerase	0.5 μl	2.5 units
ddH <sub>2</sub> O to final volume	50 μl	Not applicable

## PCR 循环

94°C 2-5 min

94°C 30 sec

50-60°C 30 sec

72°C 1-2 kb/min

72°C 5-10 min



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。
3. 如果RNA模板GC含量丰富或者有复杂二级结构, 可以先只加RNA模板、引物和RNase free H<sub>2</sub>O混匀, 65°C 变性5分钟, 冰上冷却, 短暂离心后加入其它成分继续下面的反转录步骤。
4. THERMO H<sup>+</sup> RTase/RNase Inhibitor Mix非常粘稠, 溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失, 用前请点甩离心后使用, 并且避免吸头外壁沾附损失。可以每次按照0.8μl使用, 也不影响使用效果。