

M5 Hiper AMV Reverse Transcriptase

AMV 反转录酶

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Hiper AMV Reverse Transcriptase	10000U	MF893-01
M5 Hiper AMV Reverse Transcriptase	5×10000U	MF893-05

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 24 个月。

【产品简介】

M5 Hiper AMV Reverse Transcriptase 是基因工程改造后的 AMV 反转录酶，增强了热稳定性。该酶可以用来合成 cDNA 第一链，同传统的 M-MLV RT 相比，该酶在温度升高（42-55°C，最高可达 60°C）时有更好的特异性，cDNA 的产量更高。M5 Hiper AMV Reverse Transcriptase 可合成 cDNA 的最高长度达 13 kb。

【单位定义】

1 单位指以 poly(A)为模板、oligo(dT)₂₅ 为引物，在 42°C 条件下，10 分钟内催化 1 nmol 的 dTTP 掺入形成酸不溶性沉淀物所需要的酶量。

【产品组分】

	MF893-01	MF893-05
M5 Hiper AMV Reverse Transcriptase (200U/μl)	50μl	5x 50μl
5× M5 Hiper AMV RT Buffer	1ml	5x1ml

贮存溶液：20 mM Tris-HCl (pH 7.5 @ 25°C)，100 mM NaCl，0.1 mM EDTA，1 mM Dithiothreitol (DTT)，0.01% Nonidet™ P-40 (NP-40) (V/V)，50%甘油(V/V)。

【适用范围】

合成 cDNA 第一链，用于 RT-PCR 和实时 RT-qPCR，用于克隆和表达研究。

制备带标记的 cDNA 探针，用于 microarray 研究；DNA 标记和引物延伸法分析 RNA。

【使用方法】**A. 第一链 cDNA 的合成:** (以下 20 μ l 的反应体系可以用于反转录 10 ng-2 μ g 总 RNA 或 1-500 ng mRNA)

1. 将以下组分加入无核酸酶的微量离心管中:

- 1 μ l oligo(dT)₁₂₋₁₈(500 μ g/mL)或 50-250 ng 随机引物或 2 pmole 基因特异性引物
- 10 ng-2 μ g 总 RNA 或 1-500 ng mRNA
- 1 μ l 10 mM dNTP 混合物 (dATP, dGTP, dCTP 和 dTTP 均为 10 mM)
- 加入灭菌蒸馏水至 14 μ l

2. 混合物在 65°C 加热 5 分钟后, 迅速置于冰上。短暂离心收集组分后, 加入:

- 4 μ l 5 \times M5 Hiper AMV RT Buffer
- 1 μ l RNase 抑制剂*(40 U/ μ l)。

*注: RNase 抑制剂不随酶附送, 需要单独采购。如果起始 RNA 的量小于 50 ng, 则必须加入 RNase 抑制剂。

- 3. 用枪头反复吸打混匀组分, 若使用 oligo(dT)₁₂₋₁₈ 引物, 应 42°C 下孵育 2 分钟; 若使用的是随机引物, 应在 25°C 下孵育 5 分钟。
- 4. 加入 1 μ l M5 Hiper AMV Reverse Transcriptase (200U/ μ l) 轻轻上下颠倒混匀。如果使用的 RNA 不足 10 ng, 减少 M5 Hiper AMV Reverse Transcriptase (200U/ μ l) 添加量至 0.25 μ l, 并加入无菌蒸馏水至终体积为 20 μ l。
- 5. 42°C (也可以选择更高温度) 孵育 50 分钟。
- 6. 70°C 加热 15 分钟以终止反应。

B. PCR 反应体系和程序:

1. 在 PCR 反应管中加入下列成分:

10 \times Taq PCR 缓冲液	5 μ l
50mM MgCl ₂	1.5 μ l
10mM dNTP 混合物	1.0 μ l
上游扩增引物 (10 μ M)	1.0 μ l
下游扩增引物 (10 μ M)	1.0 μ l
Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ l)	0.4 μ l
2 μ l cDNA (来自于第一链合成反应)	2.0 μ l
灭菌蒸馏水	至 50 μ l

2. 变性: 94°C 加热 2 分钟。

3. 进行 15 个到 40 个 PCR 循环。退火和延伸条件需要根据 Taq DNA 聚合酶而设定。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。