

Evo M-MLV Plus cDNA 合成试剂盒

Evo M-MLV Plus 1st Strand cDNA Synthesis Kit

Code No. AG11615

包装量:	50 rxns / 20 μ l
保存温度:	-20 $^{\circ}$ C

➤ 产品概述

本制品是应用反转录酶从RNA合成1st Strand cDNA的试剂盒，包含1st Strand cDNA合成所需所有试剂。该制品使用了反转录酶Evo M-MLV Plus Reverse Transcriptase，具有很强的cDNA延伸能力。该制品在Evo M-MLV Reverse Transcriptase的基础上进行了改造，使其非常适合于含有复杂二级结构的RNA或者长链RNA的反转录。本制品可抑制反转录酶与具有复杂结构RNA的非特异结合及延伸，进而获得特异性好、完整性好的全长cDNA。该制品适合于cDNA文库构建及全长cDNA合成等。

➤ 保存

保存温度: -20 $^{\circ}$ C
运输温度: 干冰运输

➤ 活性定义

以Poly(A)为模板，Oligo (dT)为引物，在37 $^{\circ}$ C条件下，10分钟内催化掺入1nmol的dTTP所需酶量定义为1个活性单位(U)。

➤ 注意事项

1、Evo M-MLV Plus RTase 甘油浓度较高，使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液枪轻轻吸打混匀，过程中尽量避免起泡，然后再进行使用。

2、5X RTase Plus Reaction Buffer 溶解后如有不溶物请充分混匀至沉淀全部消失。

3、所有反应混合液需要在冰上配制。

➤ 产品组成

Evo M-MLV Plus RTase (200U/ μ l)	50 μ l
5X RTase Plus Reaction Buffer	200 μ l
RNase Inhibitor (40U/ μ l)	25 μ l
dNTP Mix (10 mM each)	50 μ l
Oligo dT (18T) Primer (50 μ M)	50 μ l
Random 6 mers Primer (50 μ M)	100 μ l
RNase free water	1 ml

➤ 实验操作

1) 按照下表，在冰上配制RNA模板溶液，置于PCR仪进行变性、退火反应。（此过程利于模板RNA的变性以及引物和模板特异性退火，可以提高反转录效率。）

反应体系 (10 μ l)

组分名称	加入量
Oligo dT (18T) Primer (50 μ M)	1 μ l
or Random 6 mers Primer (50 μ M)	1 μ l (0.4-2 μ l) **
dNTP Mix (10 mM each)	1 μ l
Template RNA *2	-
RNase free water	Up to 10 μ l

*1: Random 6 mers Primer建议使用量为1 μ l, 可根据实验要求进行调整, 若合成cDNA用于定量PCR时, 使用量为1-2 μ l;

*2: Total RNA推荐用量: \leq 5 μ g; mRNA推荐用量: \leq 1 μ g。

变性、退火反应条件:

65°C	5 min
4°C	-

2) 配制反转录反应体系, 合成cDNA:

组分名称	用量
上述变性、退火后反应液	10 μ l
5X RTase Plus Reaction Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor	0.5 μ l (20 U)
<i>Evo M-MLV</i> Plus RTase (200 U/ μ l)	1 μ l (200U)
RNase free water	Up to 20 μ l

合成cDNA反应条件:

30°C ^{*1}	10 min
42°C ^{*2}	30-60 min ^{*3}
95 °C	5 min ^{*4}
4°C	-

*1: 如果使用Random引物进行反转录, 此步骤为必需步骤, 可使Random引物与模板充分退火、延伸, 增加反转录效率; 如使用其他引物, 则可省略此步骤。

*2: *Evo M-MLV* Plus RTase 对具有复杂二级结构的模板同样具有良好的延伸性能, 通常可在42°C下进行反应。使用特异性下游引物进行反转录时, 有时会因为错配而产生非特异性扩增, 此时可将反应温度升高到50°C, 以提高反应特异性。

*3: 一般情况下反应延伸30 min即可, 如果目的片段过长, 可延长时间至60 min。

*4: 如果进行长片段DNA扩增时, 为保证1st cDNA链完整, 可进行70°C, 15 min失活反应。

3) PCR扩增

上述得到的cDNA 溶液可以直接用于后续PCR扩增, 反应液用量不要超过PCR反应体系的1/10。

详细信息请查阅 <https://www.agbio.com.cn>

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.