

Evo M-MLV RT 试剂盒

Evo M-MLV RT for PCR Kit

Code No. AG11604

包装量: 100 rxns
保存温度: -20 °C

产品概述

本制品是应用反转录原理对RNA进行扩增解析的试剂盒。反转录使用了本公司特别研发的M-MLV由来的新型反转录酶Evo M-MLV RTase, 具有较强的cDNA延伸能力。本制品配有反转录反应需要的所有试剂, 方便使用。合成的cDNA可直接用于PCR扩增等。

保存

保存温度: -20°C

运输温度: 干冰或者 -20°C 冰袋运输

活性定义

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

产品组成

Evo M-MLV RTase (200 U/μl)	50 μl
5X RTase Reaction Buffer	400 μl
RNase Inhibitor (40U/μl)	50 μl
dNTP Mix (10 mM each)	100 μl
Oligo dT (18T) Primer (2.5 μM)	100 μl
Random 6 mers Primer (20 μM)	100 μl
RNase free water	1 ml x 2 pcs

实验操作

1) 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。)

组分名称	用量
dNTP Mix (10mM each)	1 μl
Oligo dT Primer (2.5 μM) or Random 6 mers Primer (20 μM) or Specific Primer (2 μM)	1 μl
Template RNA*	2 μl
RNase free water	Up to 10 μl

*: Total RNA推荐用量: 100 pg - 1 μg; 最多可加至5 μg。

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 μl
5X RTase Reaction Buffer	4 μl
RNase Inhibitor (40U/ μl)	0.5 μl
<i>Evo M-MLV</i> RTase (200 U/ μl)	0.5 μl
RNase free water	Up to 20 μl

合成cDNA反应条件^{*1}:

42(or 50°C) ^{*2}	15 ~30 min
95°C ^{*3}	5 min
4°C	-

*1: 如果使用 Random 引物进行反转录, 需要在反应开始前进行 30°C 反应 10 min 处理, 可使 Random 引物与模板充分退火、延伸, 增加反转录效率。

*2: 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: 如果进行长片段DNA扩增时, 为保证1st cDNA链完整, 可将 95°C 5 min 替换为 70 °C、15 min, 进行失活反应。

详细信息请查阅 www.agbio.com.cn

3) PCR扩增:

选择合适PCR扩增用试剂, 进行cDNA的PCR扩增。

PCR扩增时, 上述反转录反应液用量不要超过PCR反应体系的1/10。