

版本号: NG170207

# TIANSeq M-MLV (RNase H<sup>-</sup>)

## TIANSeq M-MLV(RNase H<sup>-</sup>)反转录酶

目录号: NG212

### 产品内容

产品组成	NG212-01 (10,000 U)
TIANSeq M-MLV (200 U/μl)	2 × 25 μl
5 × M-MLV RT Buffer	2 × 150 μl
100 mM DTT	100 μl

### 储存条件

-25°C~-15°C 保存。保质期：一年。

---

## 产品简介

TIANSeq M-MLV是一种没有RNase H活性的RNA依赖的DNA聚合酶。可以催化以RNA或DNA-RNA杂交链为模板的互补DNA的聚合反应。本酶的RNase H结构域经过点突变分子改造，从而实现了该酶RNase H活性的缺失，这种分子改造不但使得本产品与M-MLV野生型相比具有更高的热稳定性，而且还提高了本产品的反转录效率和对长片段cDNA的反转录能力。

## 产品特点

**酶活效率高：**高效的逆转录酶活性，后续实验兼容性好。

**底物范围广：**适用于所有RNA，尤其是具有复杂二级结构的RNA模板。

**反转片段长：**cDNA第一链合成可以达12.3 kb。

## 适用范围

- 1.在二代测序（NGS）应用中，用于RNASeq文库构建过程中cDNA第一链的合成；
- 2.全长cDNA第一链合成
3. cDNA文库的构建；
4. 一步法RT-PCR；
5. RACE分析。

## 产品来源

重组*E. coli*菌株,含有从莫洛尼氏鼠中克隆的改良后的莫洛尼氏鼠白血病病毒逆转录酶基因，基因已通过点突变使RNase H活性缺失。蛋白分子量大小约为：75.9 kDa。

## 活性单位

1单位活力定义为在37°C，10分钟内，以polyr(A)/Oligo(dT)作为模板和引物，将1 nM dTTP掺入到酸不溶物质所需的酶量。

---

## 操作步骤（cDNA第一链合成参考步骤）

1. 将模板RNA在冰上解冻；引物、5× M-MLV RT Buffer、dNTPs混合液、100 mM DTT和RNase-free ddH<sub>2</sub>O在室温（15~25℃）条件下解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。
2. 按照下表的体系在冰浴的无核酸酶的离心管中配制混合液：

组分	体积 (μl)
RNA模板	1 ng~1 μg Total RNA 或1 ng~250 ng Poly(A) mRNA
50 μM Oligo-dT <sub>(15-20)</sub> 或者 50 μM Random Primer或者 10 μM 基因特异引物	1~2 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl
RNase free H <sub>2</sub> O	补充至12 μl

3. 65℃ 孵育5 min，然后置于冰上2 min。
4. 在上述反应液的基础上继续加入下表所列的反转录组分：

组分	体积 (μl)
上述反应液	12 μl
5× M-MLV RT Buffer	4 μl
RNasin (40 U/ μl)	1 μl
TIANSeq M-MLV (200 U/μl)	1 μl
100 mM DTT	2 μl
总体积	20 μl

5. 如果引物为Random Primer则需将体系现在25℃下孵育10 min；如果引物为Oligo-dT和基因特异性引物则需将体系现在25℃下孵育2 min。
6. 42℃ 孵育60 min。
7. 70℃ 加热15 min终止反应，置于冰上进行后续实验或冷冻保存。如果后续进行PCR反应，则cDNA产物用量不应超过PCR反应体系的1/10。

---

## 酶蛋白性质描述

性质	蛋白描述
蛋白纯度	>99%
酶活性	20,000~28,880 U/mg
单链核酸外切酶活性	2000 U酶中, <2.0%
双链核酸外切酶活性	2000 U酶中, <1.0%
双链核酸内切酶活性	2000 U酶中, 未检出
宿主基因组污染	2000 U酶中, <10拷贝
非特异RNase残留	2000 U酶中, 未检出

### 注意事项: 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 用于cDNA合成反应的溶液试剂尽可能用DEPC进行处理, 并在高压灭菌后使用。有些试剂不能高压灭菌时, 首先用经过灭菌的器具、水等配制溶液后, 再将溶液进行滤除菌处理。
2. RNA样品要避免基因组DNA污染。
3. 避免反复冻融RNA, 使RNA保持在冰浴中处融化状态。
4. 当使用酶类时, 应轻轻混匀, 避免起泡; 分取之前要小心地离心收集到反应管底部, 由于酶粘度高, 吸取时应慢慢吸取。
5. 若后续PCR反应需要扩增的片段较长 (>5 kb), 则建议用RNase H对cDNA产物进行处理。处理方法为: 向反转录产物中 (20  $\mu$ l体系) 加入1  $\mu$ l RNase H (5 U/ $\mu$ l), 37 $^{\circ}$ C下孵育20 min, 之后65 $^{\circ}$ C处理10 min进行酶灭活。

### 酶保存液成分

20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01%

---