

Code No. 2641A

研究用

Takara

Reverse Transcriptase M-MLV
(RNase H-)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 酶贮存溶液	1
● 起 源	1
● 活性定义	1
● 质量控制	1
● 用 途	1
● 添附 Buffer 组成	2
● 1st-Strand cDNA 合成的实验操作方法	2
● 使用 λ RNA 进行 RT-PCR 反应的实验例	3
● 使用 HL60 Total RNA 进行 Human TFR 基因 (4.4 kb) 的 RT-PCR 反应的实验例	4
● 使用本制品进行 2 Step Real Time RT-PCR 反应的实验例	5

● 制品说明

本制品是通过基因重组技术克隆表达的缺失突变型RNase H-的M-MLV反转录酶。一般的野生型M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) 具有以下几种活性: 依赖于RNA的DNA聚合酶活性; 依赖于DNA的DNA聚合酶活性; RNase H活性。由于RNase H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-MLV (RNase H-) 的RNase H活性缺失, 延伸能力强, 可用于较长的cDNA合成以及高比例的全长cDNA文库的构建等。

● 制品内容

Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (200 U/ μ l)	10,000 U
5X Reverse Transcriptase M-MLV Buffer	1 ml

● 保存: -20°C 。

● 酶贮存溶液

50%	Glycerol
20 mM	Tris-HCl pH7.8(25°C)
100 mM	NaCl
1 mM	Dithiothreitol
1 mM	EDTA

● 起源: Purified from an *E.coli* strain expressing a recombinant enzyme.

● 活性定义

以 Poly (rA) ·Oligo (dT) 为模板/引物, 在 37°C 、10 分钟条件下, 掺入 1 nmol 的 $[^3\text{H}]$ dTTP 所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

● 质量控制:

请查阅各批次 Certificates of Analysis (CoA)。产品 CoA 请在 Takara Bio Inc.网站中下载:
http://catalog.takara-bio.co.jp/search/doc_index.php。

● 用途:

1. 1st-Strand cDNA 的合成。
2. cDNA Probe 的制备。
3. RT-PCR 反应以及 Real Time RT-PCR 反应。

● 添附 Buffer 组成 (保存: -20°C)

5X Reverse Transcriptase M-MLV Buffer

Tris-HCl (pH8.3)	250 mM
KCl	375 mM
MgCl ₂	15 mM
DTT	50 mM

● 1st-Strand cDNA 合成的实验操作方法

1. Microtube 管中配制下列模板 RNA/引物混合液, 全量 6 μl 。

试剂名称	使用量
模板 RNA	1 ng~1 μg *
Oligo(dT)12-18 Primer (50 μM) 或 Random Primers (25 μM) 或 Specific Primer (10 μM)	1 μl
dNTP Mixture (各 10 mM)	0.5 μl
RNase free H ₂ O	up to 6 μl

* Total RNA 的使用量一般为 1 ng~1 μg ; mRNA 的使用量一般为 10 pg~1 μg 。

2. 65°C 保温 5 分钟后迅速在冰上急冷 2 分钟以上。
3. 离心数秒钟使模板 RNA/引物的变性溶液聚集于 Microtube 管底部。
4. 在上述 Microtube 管中配制下列反转录反应液。

试剂名称	使用量
上述模板 RNA/引物变性溶液	6 μl
5X Reverse Transcriptase M-MLV Buffer	2 μl
RNase Inhibitor (40 U/ μl)	0.25 μl
Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (200 U/ μl)	0.25 μl ~1 μl *
RNase free H ₂ O	up to 10 μl

* 当起始模板 RNA 量 >500 ng 时, Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) 的使用量应 >0.25 μl 。

5. 42°C 保温 1 小时*。
* 以 Random Primers 作为反转录引物时应先进行 30°C , 10 分钟反应, 然后再在 42°C 条件保温 1 小时。
6. 70°C 保温 15 分钟后冰上冷却, 得到的 cDNA 溶液可直接用于 2nd-Strand cDNA 的合成或者 PCR 扩增等, PCR 扩增时 cDNA 溶液的使用量建议使用 1 μl ~5 μl 。

● 使用 λ RNA 进行 RT-PCR 反应的实验例

本实验中使用的 λ RNA 为带有 Poly(A) 的 λ DNA 的转录产物。本实验中分别扩增了 1 kb、3 kb、5 kb、8 kb 和 10 kb 的目的 DNA 片段。

1. 反转录反应

① 在 Microtube 管中配制下列模板 RNA/引物混合液。

试剂名称	使用量
λ RNA (100 ng/ μ l)	1 μ l
Oligo(dT) ₁₈ Primer (50 μ M)	1 μ l
dNTP Mixture (10 mM each)	0.5 μ l
RNase free H ₂ O	5 μ l
Total Volume	7.5 μ l

- ② 65°C 保温 5 分钟后迅速在冰上急冷 2 分钟以上。
③ 离心数秒钟使模板 RNA/引物的变性溶液聚集于 Microtube 管底部。
④ 在上述 Microtube 管中配制下列反转录反应液。

试剂名称	使用量
上述模板 RNA/引物变性溶液	7.5 μ l
5X Reverse Transcriptase M-MLV Buffer	2 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0.25 μ l
Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (200 U/ μ l)	0.25 μ l
Total Volume	10 μ l

- ⑤ 42°C 保温 1 小时。
⑥ 70°C 保温 15 分钟后冰上冷却，得到的 cDNA 溶液用于 PCR 扩增。

2. PCR 反应

① 按下列组成配制 PCR 反应液，全量 50 μ l。

试剂名称	使用量
上述 cDNA 溶液	2 μ l
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	8 μ l
Forward Primer (10 μ M)	1 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l
10X LA PCR™ Buffer II (Mg ²⁺ Plus)	5 μ l
TaKaRa LA Taq® (5 U/ μ l)	0.5 μ l
灭菌水	32.5 μ l
Total Volume	50 μ l

② PCR 反应条件如下:

1 kb、3 kb 的 PCR 反应条件

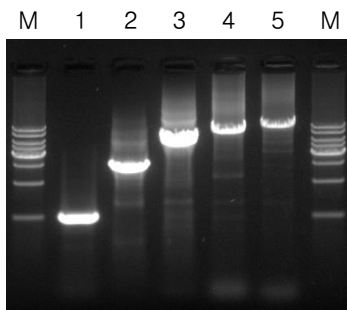
94°C, 1 min
 94°C, 30 sec }
 55°C, 30 sec } 30 Cycles
 72°C, 3 min }
 72°C, 10 min

5 kb、8 kb、10 kb 的 PCR 反应条件

94°C, 1 min
 98°C, 20 sec }
 68°C, 10 min } 30 Cycles
 72°C, 10 min

3. RT-PCR 扩增结果

PCR 反应结束后, 取 5 μl 的 PCR 反应液进行了琼脂糖凝胶电泳, 结果如下。



M: 1 kb DNA Ladder (Dye Plus) (Code No. 3426)

1: 1 kb 的 PCR 扩增结果

2: 3 kb 的 PCR 扩增结果

3: 5 kb 的 PCR 扩增结果

4: 8 kb 的 PCR 扩增结果

5: 10 kb 的 PCR 扩增结果

● 使用 HL60 Total RNA 进行 Human TFR 基因 (4.4 kb) 的 RT-PCR 反应的实验例

1. 反转录反应

① 在 Microtube 管中配制下列模板 RNA/引物混合液。

试剂名称	使用量
HL60 Total RNA (100 ng/μl)	1 μl
Oligo(dT) ₁₈ Primer (50 μM)	1 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	0.5 μl
RNase free H ₂ O	5 μl
Total Volume	7.5 μl

② 65°C 保温 5 分钟后迅速在冰上急冷 2 分钟以上。

③ 离心数秒钟使模板 RNA/引物的变性溶液聚集于 Microtube 管底部。

④ 在上述 Microtube 管中配制下列反转录反应液。

试剂名称	使用量
上述模板 RNA/引物变性溶液	7.5 μl
5X Reverse Transcriptase M-MLV Buffer	2 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.25 μl
Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (200 U/μl)	0.25 μl
Total Volume	10 μl

- ⑤ 42°C保温 1 小时。
 ⑥ 70°C保温 15 分钟后冰上冷却，得到的 cDNA 溶液用于 PCR 扩增。

2. PCR 反应

- ① 按下列组成配制 PCR 反应液，全量 50 μ l。

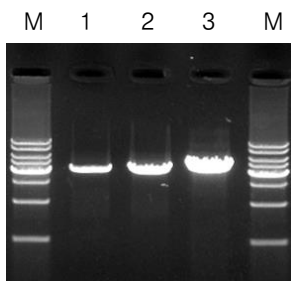
试剂名称	使用量
上述 cDNA 溶液	分别取 1、2、5 μ l
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	8 μ l
Forward Primer (10 μ M)	1 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l
10X LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ Plus)	5 μ l
TaKaRa LA Taq (5 U/ μ l)	0.5 μ l
灭菌水	up to 50 μ l

- ② PCR 反应条件如下：

94°C, 1 min
 94°C, 30 sec }
 55°C, 30 sec } 30 Cycles
 72°C, 5 min }
 72°C, 10 min

3. RT-PCR 扩增结果

PCR 反应结束后，取 5 μ l 的 PCR 反应液进行了琼脂糖凝胶电泳，结果如下。



M : 1 kb DNA Ladder (Dye Plus) (Code No. 3426)
 1 : 1 μ l cDNA 溶液扩增结果
 2 : 2 μ l cDNA 溶液扩增结果
 3 : 5 μ l cDNA 溶液扩增结果

● 使用本制品进行 2 Step Real Time RT-PCR 反应的实验例

本实验以 Mouse Liver Total RNA 为模板，使用 2 Step Real Time RT-PCR 方法，扩增 Mouse GAPDH 基因。实验时，首先以 Mouse Liver Total RNA 为模板进行反转录反应，然后将得到的 cDNA 溶液使用 EASY Dilution 按 10 倍梯度稀释，再将相当于 1 pg~100 ng Total RNA 量的 cDNA 作为模板，进行 Real Time PCR 扩增（使用了嵌合荧光法），制作标准曲线。具体实验过程如下：

1. 反转录反应

以 Mouse Liver Total RNA 为模板进行反转录反应。

① 按下列组成配制 RT 反应液（反应液请在冰上配制）。

试剂名称	使用量
5X Reverse Transcriptase M-MLV Buffer	2 μ l
dNTP Mixture (各 10 mM)	0.5 μ l
Random 6 mers (100 μ M)*1	0.5 μ l
Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (200 U/ μ l)	0.25 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0.25 μ l
Total RNA	500 ng
RNase free H ₂ O	up to 10 μ l
Total Volume	10 μ l*2

*1 反转录引物可使用以下三种引物，使用量分别如下：

Random 6 mers (100 μ M) 0.5 μ l (50 pmol)

Oligo dT Primer (50 μ M) 0.5 μ l (25 pmol)

Specific Primer (2 μ M) 0.5 μ l (1 pmol)

*2 反应体积可按需求相应放大，10 μ l 的反应体系中 Total RNA 的最大使用量为 500 ng。

② 反转录反应条件如下：

42°C 10 min (反转录反应)

95°C 2 min (反转录酶的失活反应)

2. Real Time PCR 反应

Target: Mouse GAPDH。

Template: Mouse Liver Total RNA 经反转录反应后的 cDNA 溶液。

使用 EASY Dilution (for Real Time PCR) (Code No. 9160) 将 cDNA 溶液按 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 倍梯度稀释 (10 倍梯度稀释) 后，各取 2 μ l 进行 Real Time PCR 反应。此时 25 μ l PCR 反应液中的 cDNA 添加量分别相当于从 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg 的 Total RNA 反转录得到的 cDNA 量。

Negative Control 的模板使用了灭菌水。

扩增长度: 108 bp。

使用仪器: Smart Cyclor System。

检测方法: 嵌合荧光法。

① 按下列组成配制 Real Time PCR 反应液（反应液请在冰上配制）。

PCR 反应使用了 TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] (Tli RNaseH Plus)。

试剂名称	使用量
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> (2X)	12.5 μ l
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l
灭菌水	9.5 μ l
Total Volume	23.0 μ l

② 将上述 PCR 反应液加入至 Real Time PCR 用反应管中，然后再加入 2 μ l*的上述各 cDNA 的梯度稀释液。

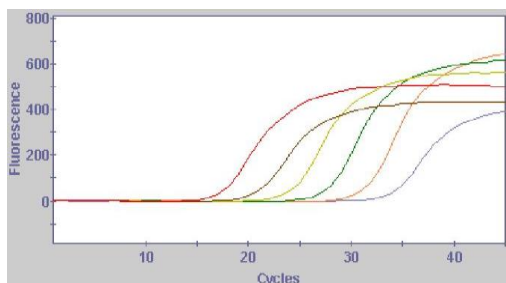
* RT 反应液(即各 cDNA 的梯度稀释液)的加入量不要超过 Real Time PCR 反应总体积的 1/10 (V/V) 量。

③ 进行 Real Time PCR 反应，PCR 反应条件如下：

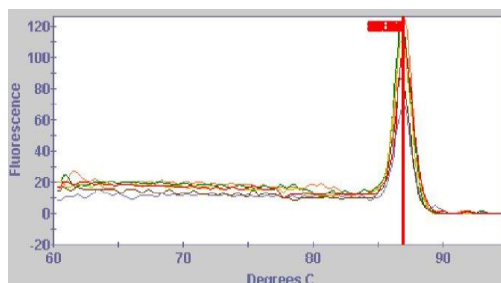
95°C 10 sec 1 Cycle
95°C 5 sec } 45 Cycles
60°C 20 sec }

④ Real Time PCR 反应结果。

Real Time PCR 扩增曲线图及融解曲线图如下：

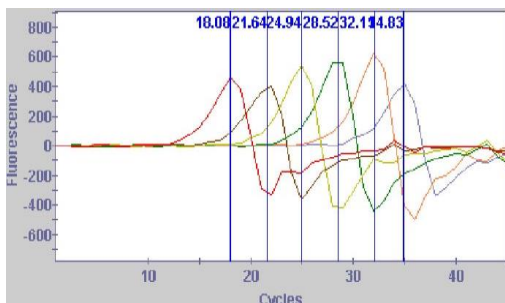


扩增曲线图

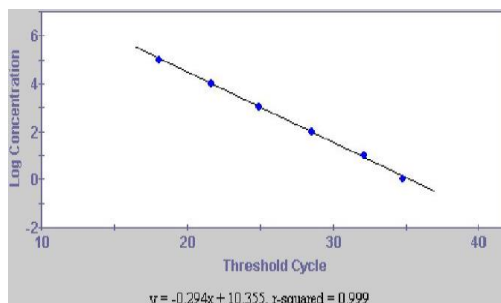


融解曲线图

反应结束后，根据扩增曲线的 2nd derivative 得到各扩增曲线的 Ct 值，制作标准曲线。



2nd derivative



标准曲线图

⑤ 结果分析。

本实验检测到了 Mouse Liver Total RNA 1 pg~100 ng 相当量的 cDNA。分析融解曲线可知，无论哪一种浓度的模板都能够得到单一的 PCR 扩增产物。同时标准曲线的线性关系良好，在实验浓度范围内能够进行准确定量。

TaKaRa LA Taq and TB Green are registered trademarks of Takara Bio Inc.

LA PCR and *Premix Ex Taq* are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

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。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>