

Code No. 2641Q

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 $\lambda$ 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/ $\mu$ l)	2,000 U
5X Reverse Transcriptase M-MLV Buffer	500 $\mu$ l

● 保存:  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

## ● 酶贮存溶液

50%	Glycerol
20 mM	Tris-HCl pH7.8(25 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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](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:  $-20^{\circ}\text{C}$ )

5X Reverse Transcriptase M-MLV Buffer

Tris-HCl (pH8.3)	250 mM
KCl	375 mM
MgCl <sub>2</sub>	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  $\mu\text{l}$ 。

试剂名称	使用量
模板 RNA	1 ng~1 $\mu\text{g}$ *
Oligo(dT)12-18 Primer (50 $\mu\text{M}$ ) 或 Random Primers (25 $\mu\text{M}$ ) 或 Specific Primer (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
dNTP Mixture (各 10 mM)	0.5 $\mu\text{l}$
RNase free H <sub>2</sub> O	up to 6 $\mu\text{l}$

\* Total RNA 的使用量一般为 1 ng~1  $\mu\text{g}$ ; mRNA 的使用量一般为 10 pg~1  $\mu\text{g}$ 。

2.  $65^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{l}$
5X Reverse Transcriptase M-MLV Buffer	2 $\mu\text{l}$
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0.25 $\mu\text{l}$
Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (200 U/ $\mu\text{l}$ )	0.25 $\mu\text{l}$ ~1 $\mu\text{l}$ *
RNase free H <sub>2</sub> O	up to 10 $\mu\text{l}$

\* 当起始模板 RNA 量 >500 ng 时, Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) 的使用量应 >0.25  $\mu\text{l}$ 。

5.  $42^{\circ}\text{C}$ 保温 1 小时\*。  
\* 以 Random Primers 作为反转录引物时应先进行  $30^{\circ}\text{C}$ , 10 分钟反应, 然后再在  $42^{\circ}\text{C}$ 条件保温 1 小时。  
6.  $70^{\circ}\text{C}$ 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  $\mu\text{l}$ ~5  $\mu\text{l}$ 。

## ● 使用 $\lambda$ RNA 进行 RT-PCR 反应的实验例

本实验中使用的  $\lambda$  RNA 为带有 Poly(A) 的  $\lambda$  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
$\lambda$ RNA (100 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTP Mixture (10 mM each)	0.5 $\mu$ l
RNase free H <sub>2</sub> O	5 $\mu$ l
Total Volume	7.5 $\mu$ 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 $\mu$ l
5X Reverse Transcriptase M-MLV Buffer	2 $\mu$ l
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (200 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total Volume	10 $\mu$ 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  $\mu$ l。

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

② PCR 反应条件如下:

1 kb、3 kb 的 PCR 反应条件

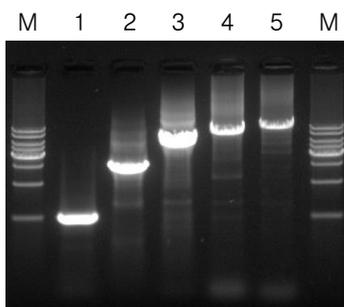
94°C, 1 min  
 94°C, 30 sec }  
 55°C, 30 sec } 30 Cycles  
 72°C, 3 min }  
 72°C, 10 min

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  $\mu$ 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 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/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTP Mixture (10 mM each)	0.5 $\mu$ l
RNase free H <sub>2</sub> O	5 $\mu$ l
Total Volume	7.5 $\mu$ 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 $\mu$ l
5X Reverse Transcriptase M-MLV Buffer	2 $\mu$ l
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (200 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total Volume	10 $\mu$ 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  $\mu$ l。

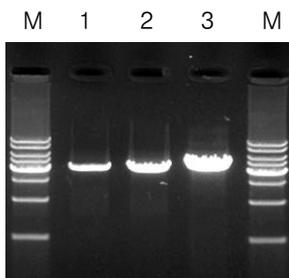
试剂名称	使用量
上述 cDNA 溶液	分别取 1、2、5 $\mu$ l
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	8 $\mu$ l
Forward Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
10X LA PCR Buffer II (Mg <sup>2+</sup> Plus)	5 $\mu$ l
<i>TaKaRa LA Taq</i> (5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
灭菌水	up to 50 $\mu$ l

- 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  $\mu$ 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  $\mu$ l cDNA 溶液扩增结果

2 : 2  $\mu$ l cDNA 溶液扩增结果

3 : 5  $\mu$ 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 $\mu$ l
dNTP Mixture (各 10 mM)	0.5 $\mu$ l
Random 6 mers (100 $\mu$ M)* <sup>1</sup>	0.5 $\mu$ l
Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (200 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total RNA	500 ng
RNase free H <sub>2</sub> O	up to 10 $\mu$ l
Total Volume	10 $\mu$ l* <sup>2</sup>

\*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  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l (50 pmol)

Oligo dT Primer (50  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l (25 pmol)

Specific Primer (2  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l (1 pmol)

\*2 反应体积可按需求相应放大，10  $\mu$ 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  $\mu$ l 进行 Real Time PCR 反应。此时 25  $\mu$ 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<sup>®</sup> *Premix Ex Taq*<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus)。

试剂名称	使用量
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> (2X)	12.5 $\mu$ l
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
灭菌水	9.5 $\mu$ l
Total Volume	23.0 $\mu$ 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  $\mu$ l\*的上述各 cDNA 的梯度稀释液。

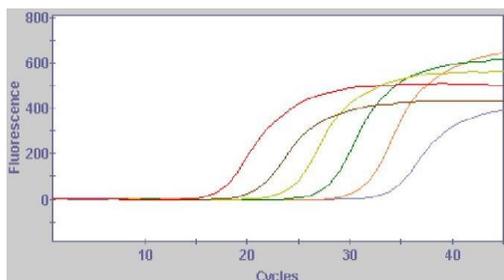
\* RT 反应液(即各 cDNA 的梯度稀释液)的加入量不要超过 Real Time PCR 反应总体积的 1/10 (V/V) 量。

③ 进行 Real Time PCR 反应，PCR 反应条件如下：

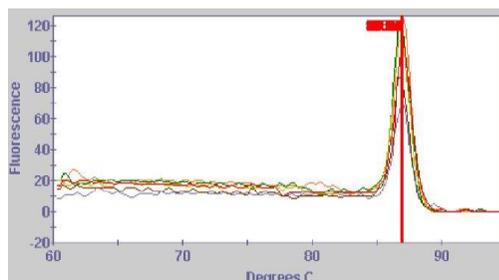
95°C 10 sec 1 Cycle  
95°C 5 sec } 45 Cycles  
60°C 20 sec }

④ Real Time PCR 反应结果。

Real Time PCR 扩增曲线图及融解曲线图如下：

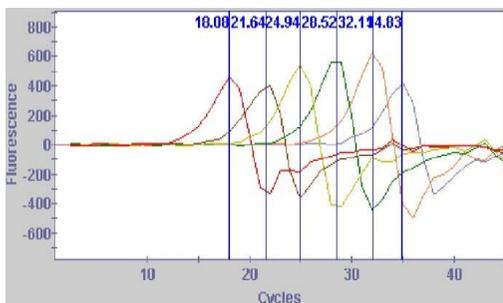


扩增曲线图

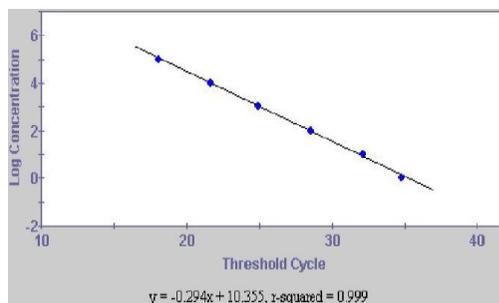


融解曲线图

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](http://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>