


ExCell Bio

MMLVRT(RNase H-)酶

User Manual

Catalog Number MB000-2041
MB000-2042
MB000-2043
MB000-2044



产品概述

M-MuLV 反转录酶(RNase H-) 是一种重组的 M-MuLV 反转录酶, 通过突变去除了 RNase H 的活性, 并增加热稳定性。它在合成第一链 cDNA 时比野生型 M-MuLV 能耐更高的温度, 50°C 时仍具有活性, 因此具有更好的特异性和更高的扩增效率, 可合成长达 10kb 的 cDNA。

含有突变的 M-MuLV 反转录酶基因的重组表达载体, 在大肠杆菌中表达和纯化制备而成, 分子量为 76.1KDa, N 端含有 6 个 His。

技术参数

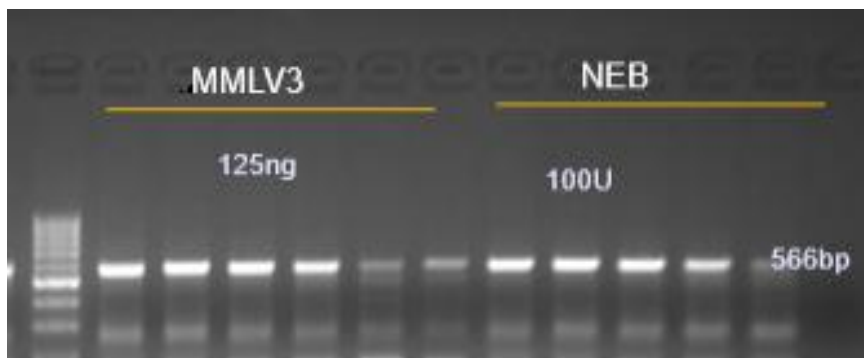
| | |
|-----------|---|
| 酶储存溶液 | 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% (v/v) NP-40, 50% (v/v) Glycerol. |
| 5x 酶反应液 | 250 mM Tris-HCl (pH 8.3 @ 25°C), 375 mM KCl, 15mM MgCl ₂ . |
| 核酸外切酶活性 | 在 50μl 反应体系中, 200U 的本酶和 1μg λ DNA-Hind III 在 37°C 下温浴 4 小时后, DNA 的电泳谱带没有明显的涂抹和降解现象。 |
| 核酸内切酶活性 | 50 μl 的反应体系中, 200 个活性单位的该酶与 1μg øx174RFI 型 DNA 37 °C 温浴 4 小时, 电泳显示小于 10% 的 RFI 型 DNA 变为 RFII 型。 |
| 大肠杆菌基因组残留 | 采用 QPCR 方法, 以 16S RNA 的保守序列进行扩增, 测得 5 U 中的大肠杆菌基因组残留小于 1 个拷贝。 |
| 活性单位浓度 | 200,000 U/ml |

活性分析

在 50μl 的反应体系中, 以 poly(rA) 为模板, oligo(dT)₁₈ 为引物, 37°C 10 分钟内将 1nmol 的 dNTP_s 掺入到酸不溶性沉淀物需的酶量为 1 个活性单位。

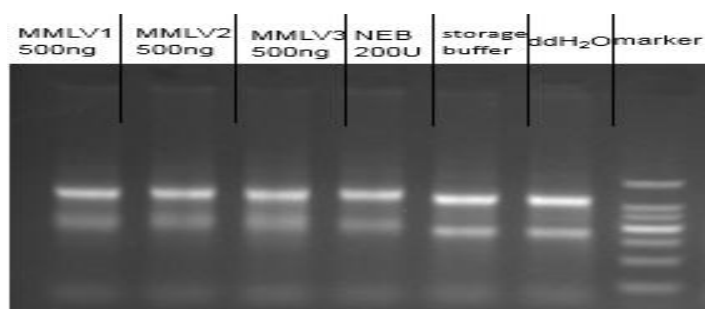
相关数据

1. 蛋白合适工作浓度



以人 Human 293T cell total RNA 为模板，加入 125ng 的 MMLV3(自产) 和 100U(NEB 同类酶)，反转录和 PCR 扩增 GAPDH 的 566nt 片段，电泳结果显示自产酶以较低的浓度(0.25mg/ml)可以达到 NEB 同类酶 (200U/μl ,1mg/ml)的反转录效果，自产酶的比活是 NEB 同类酶的四倍。

2. RNase 残留



在 10μl 反应体系中，加入 500ng 自产 (MMLV1, MMLV2 和 MMLV3) 的 200U NEB 同类酶和 1μg 16S,23S rRNA 在 37℃ 下温浴 4 小时后，RNA 的电泳谱带没有明显的降解现象。

产品应用

第一链CDNA合成，用于RT-PCR和Realtime RT-PCR；

提高反应温度，降低二级结构对逆转录的影响；

合成CDNA用于克隆和表达研究；

DNA标记；

引物延伸法分析RNA。


产品规格

| | 货号 | 规格 |
|---|------------|-----------|
| 1 | MB000-2041 | 4,000 U |
| 2 | MB000-2042 | 10,000 U |
| 3 | MB000-2043 | 40,000 U |
| 4 | MB000-2044 | 200,000 U |


产品组分及储存条件

| 货号 | 规格 | 组分 | | |
|------------|-----------|---------------------------|----------------|--------------------------------|
| | | M-MuLV 反转录酶 (RNase H-) | 0.1M DTT (10×) | M-MuLV Reaction Buffer (5×) |
| MB000-2041 | 4,000 U | 1 管 | 0.2 mlx1 管 | 0.5 mlx1 管 |
| MB000-2042 | 10,000 U | 1 管 | 0.5 mlx1 管 | 1.0 mlx1 管 |
| MB000-2043 | 40,000 U | 1 管 | 1.0 mlx1 管 | 1.6 mlx1 管 |
| MB000-2044 | 200,000 U | 1 管 | 1.5 mlx3 管 | 1.6 mlx5 管 |

-20°C条件下运输和保存。


实验流程

以第一链 cDNA 合成反应为例

1.按照以下配制反应体系

| 试剂名称 | 使用量 |
|---|------------|
| 模板 RNA | 1 ng~1 µg* |
| Specific Primer (10 µM) Random Primers (25 µM) Oligo(dT)18 Primer (50 µM) | 1 µl |
| ddH ₂ O (RNase free) | Up to 5 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. 70°C 保温 10 分钟后迅速在冰上急冷 2 分钟以上，离心数秒钟使模板 RNA/引物的变性溶液聚集于试管底部。

3. 在上述管中配制加入下列反应液

| 试剂名称 | 使用量 |
|-------------------------------|---------------|
| 上述模板 RNA/引物变性溶液 | 5 µl |
| 5x M-MuLV Reaction Buffer | 2 µl |
| 0.1M DTT (10x) | 1 µl |
| dNTP Mixture (10 mM) | 0.5 µl |
| RNase Inhibitor (40 U/ µl) | 0.25 µl |
| M-MuLV (RNase H-) (200 U/ µl) | 0.25 µl~1 µl* |
| H ₂ O(RNase free) | Up to 10 µl |

*起始模板 RNA 量大于 500 ng 时，M-MuLV (RNase H-) 的使用量应大于 0.25 µl。

4. 42° C~50° C 保温 30~50min*。

* 以 Random Primers 作为反转录引物时应先进行 25°C、10 分钟反应，然后再在 42°C~50°C 条件保温 30~50 min。

5. 70°C 保温 15 分钟后冰上冷却，得到的 cDNA 溶液可直接用于第二链 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。

注意事项

1. 65 °C 加热 20 分钟可以失活。