

HiFi II M-MLV(H-) Reverse Transcriptase

HiFi II M-MLV(H-) 逆转录酶

项目号: H665664 (10000 U)

保存条件: -20°C 保存。

产品内容

组分	H665664 10000 U
HiFi II M-MLV(H-) (200U / μ L)	50 μ L
5 \times SuperRT Buffer	1 mL

产品简介

HiFi II M-MLV(H-) 是经过突变的 M-MLV 基因利用大肠杆菌工程菌进行重组与表达的 逆转录酶, 该酶能够催化以 RNA 或 DNA: RNA 杂交链为模板的互补 DNA 聚合反应。经过突变的 HiFi II M-MLV(H-) 逆转录酶 RNase H 活性缺失, 减少了逆转录反应中 RNA 的降解, 更容易获得全长的 cDNA。HiFi II M-MLV(H-) 逆转录酶能在 55°C 合成第一条链 cDNA, 提供更高的特异性, 稳定性强, 可以合成最大 12 kb 的 cDNA, cDNA 产量高。适用于第一链 cDNA 的合成、RT-PCR、RT-qPCR 以及全长 cDNA 文库的构建等。

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 所需酶量定义为一个活性单位(U)。

质量控制

200 U 的本酶和 1 μ g 的 16 S, 23 S rRNA 在 37°C 下反应 1 小时, RNA 的电泳谱带不发生变化。

注意事项

1. 在操作过程中应避免 RNase 污染，防止 RNA 降解或实验中的交叉污染，建议在专门的区域进行 RNA 操作，使用专门的仪器和耗材，操作人员戴口罩和一次性手套并经常更换手套。
2. 实验尽量使用一次性塑料器皿，若使用玻璃器皿，应使用 0.1%DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在 37℃ 处理 12 小时，并在 120℃ 下高压灭菌 30 分钟后使用，或者将玻璃器皿在 180℃ 下干热灭菌 60 分钟后使用。实验中用到的无菌水应使用 0.1%的 DEPC 处理后进行高压灭菌。
3. 本试剂盒中的所有试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。所涉及的酶类使用后应尽快放回 -20℃，避免反复冻融。
4. 若起始 RNA 的量小于 50 ng，建议加入 RNA 酶抑制剂（RNasin）。本试剂盒并未提供。

使用方法

注意：10 ng-5 μg 总 RNA 可建立 20 μL 反应体系，如果总 RNA 量大于 5 μg，请按比例扩大反应体系。

i 逆转录操作步骤：

1. 将 RNA 模板、引物、dNTP Mix、SuperRT Buffer、HiFi II M-MLV(H-) 和 RNase-Free Water 溶解并置于冰上备用。
2. 根据以下表格配制反应体系，总体积为 20 μL。

试剂	20 μl 反应体系	终浓度
dNTP Mix, 2.5 mM Each	4 μl	500 μM Each
Oligo-dT Primer, 100 μM 或 Random Primers, 50 μM 或 Specific Primer, 10 μM	1 μl	/
RNA Template	X μl	1 ng-5 μg
5×SuperRT Buffer	4 μl	1 ×
HiFi II M-MLV(H-) (200U / μL)	0.5-1 μL	/
RNase-Free Water	up to 20 μL	/

注意：若起始 RNA 的量小于 50ng，则建议加入 RNA 酶抑制剂（RNasin）。本试剂盒并未提供。

3. 涡旋震荡混匀，短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。
4. 55℃ 孵育 1-30 分钟，85℃ 孵育 5 分钟。反应结束后，短暂离心，置于冰上冷却。

5. 逆转录产物可直接用于 PCR 反应和荧光定量 PCR 反应，或置于-20℃长期保存。

ii 若逆转录效率低，或 RNA 模板二级结构复杂、GC 含量高时，建议采用以下步骤：

1. 将 RNA 模板、引物、dNTP Mix、SuperRT Buffer、HiFi II M-MLV (H-) 和 RNase-Free Water 溶解并置于冰上备用。

2. 根据以下表格配制反应体系，总体积为 15 μ L 。

试剂	20 μ l 反应体系	终浓度
dNTP Mix, 2.5 mM Each	4 μ l	500 μ M Each
Oligo-dT Primer, 100 μ M 或 Random Primers, 50 μ M 或 Specific Primer, 10 μ M	1 μ l	/
RNA Template	X μ l	1 ng-5 μ g
RNase-Free Water	up to 15 μ L	/

3. 70℃孵育 10 分钟，迅速冰浴 2 分钟。

4. 短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。

5. 向以上反应液中加入 4 μ L 5 \times SuperRT Buffer。

注意:若起始 RNA 的量小于 50 ng, 则建议加入 RNA 酶抑制剂(RNasin)。本试剂盒并未提供。

6. 轻轻吹打混匀，若反转录引物为 Oligo-dT Primer 或 Specific Primer 时，

7. 42℃孵育 2 分钟；若反转录引物为 Random Primers, 则 25℃孵育 10 分钟。

8. 加入 1 μ L HiFi II M-MLV (H-) (200 U/ μ L)，轻轻吸打混匀。55℃孵育 50 分钟。85℃孵育 5 分钟。反应结束后，短暂离心，置于冰上冷却。

9. 逆转录产物可直接用于 PCR 反应和荧光定量 PCR 反应，或置于-20℃长期保存。