

M-MLV GIII Reverse Transcriptase

REF: EG15124S

储运条件

-20°C

产品组成

组分	规格
M-MLV GIII Reverse Transcriptase (200 U/μl)	50 μl
5× M-MLV First Strand Buffer	500 μl
0.1 M DTT	100 μl

产品简介

M-MLV GIII Reverse Transcriptase 是通过基因修饰和重组技术获得的第三代 M-MLV 逆转录酶。该酶相对于野生型 M-MLV 逆转录酶去除了 RNase H 活性，并大幅提高了热稳定性（最适反应温度为 50°C），从而大大提高了合成第一链 cDNA 时的特异性和长度（最长可达 12 kb），增强了对 RNA 复杂二级结构的耐受性。

酶活单位定义

37°C条件下，以 Poly(A)-Oligo(dT) 为模板 / 引物，在 10 min 内，掺入 1 nmol 的 [³H] dTTP 所需要的酶量定义为 1 个活性单位（U）。

质量控制

宿主原性DNA检测

无宿主 DNA 污染。

核酸内切酶残留检测

将酶液与超螺旋质粒 DNA 在 37°C 温育 4 h，通过 DNA 电泳检测质粒无变化。

核酸外切酶残留检测

将酶液与双链 DNA 底物在 37°C 温育 16 h，通过 DNA 电泳检测双链 DNA 底物无变化。

使用方法

第一链 cDNA 合成步骤

1. 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
引物	x μl
Oligo(dT) ₂₀	终浓度 2.5 μM
或随机引物	终浓度 2.5 ng/μl
或基因特异性引物	终浓度 0.25 μM
模板 RNA ^a	50 ng~1 μg/20 μl
5× M-MLV First Strand Buffer	4 μl
0.1 M DTT	1 μl
M-MLV GIII Reverse Transcriptase (200 U/μl)	1 μl
dNTP Mix (10 mM Each)	1 μl
(可选) RNase Inhibitor (40 U/μl)	1 μl
Nuclease-Free Water	To 20 μl

a. 推荐使用试剂盒提取的已去除基因组 DNA 污染的高质量 RNA 作为模板。

2. 轻柔吸打混匀后，瞬离；

3. 若使用 Oligo(dT)₂₀ 或基因特异性引物，50°C 温育 30 min；若使用随机引物，先 25°C 温育 5 min，之后 50°C 温育 30 min；

注：若目的 cDNA 小于 3 kb，温育时间可缩短为 15 min。

4. 反应结束后，85°C 温育 5 min 以终止反应；

5. 将获得的 cDNA 溶液置于冰上，用于后续实验。

注：cDNA 溶液置于 -20°C 可保存半年；置于 -80°C 可长期储存。