保存：

所有成分请置于 – 20 °C 长期保存，保质期 3 年

Beibei Biotech. Co., Ltd.
www.beibeibio.com
贝贝生物科

Cat#.0832

Reverse Transcript Handbook

For Research Use Only

Beibei Biotech. Co., Ltd.

产品介绍:

本产品反转录酶 M-MLV 为重组表达获得，采用最新专利技术以 RNA 为模板，更高效反转录获得 cDNA 片段。

应用范围

1、cDNA 第一链的合成

2、cDNA 文库的构建

3、适用于二级结构复杂的 RNA

产品成分（所有成分请置于 – 20 °C 长期保存）

1、M-MLV Reverse Transcriptase （200 U/μl）

*使用时请置于冰盒内或冰上，避免室温长时间放置降低酶活

2、5×M-MLV Reverse Transcriptase Buffer

3、dNTP Mixture（10mM each）

4、Random 6 Primer （50μM）

5、Oligo dT_{15} Primer（50μM）

6、Rnase Free Water（DEPC Water）

操作步骤

1、模板 RNA 在冰上解冻；引物、5×M-MLV Reverse Transcriptase Buffer、dNTP Mixture 和 Rnase-free Water 在室温（ 15-25℃） 条件下解冻， 解冻后迅速置于冰上。 可简短离心，收集残留在管壁的液体于管底。

2、按照下表的体系在冰浴的无核酸酶的离心管中配制混合液:

组分	体积 （20μL）
RNA	1ng～2μg Total RNA
Primer	1μL Random 6 Primer（50μM） 或 1μL Oligo dT_{15} Primer（50μM）
dNTP（10mM）	1μL
5×Reverse Transcriptase Buffer	4μL
M-MLV Reverse Transcriptase	2μL
Rnase Free Water	补充至 20μL

3、在 PCR 仪中 42℃孵育 60min，然后 72℃加热 5min 终止反应，置于冰上进行后续实验或冷冻保存。

注意事项:

1、避免反复冻融样本 RNA，刚制备的完整性好、 纯度高的 RNA 作为模板为最佳。

2、在使用 Random 6 Primer 时，请注意随机引物量和总 RNA 量之间的关系，一般建议 50 ng 随机引物/5 μg 总 RNA。当提高 Random/RNA 的比率将会提高短片段（～500 bp）cDNA 的合成；而当降低 Random/RNA 的比率将会提高长片段 cDNA 的合成。

3、如果模板 RNA 富含二级结构， 可以先在 65℃条件下预处理 5 min。

4、如果反转录中使用 PCR 下游引物，为了防止引物错配导致的非特异扩增， 可以在 50℃条件下进行反转录。