

产品目录号:

M1701
M1705

M-MLV 反转录酶简明操作步骤



注意: 这是节选操作步骤, 详细英文说明书见 <http://www.promega.com/tbs/9pim170/9pim170.html>
本简明操作步骤电子版见 www.promega.com.cn

cDNA 第一链合成操作步骤:

请使用者准备:

- 重组 RNasin®核酸酶抑制剂 (目录号 N2511)
- dATP,10mM(目录号 U1201,100mM)
- dCTP,10mM(目录号 U1221,100mM)
- dGTP, 10mM(目录号 U1211,100mM)
- dTTP, 10mM(目录号 U1231,100mM)
- 无核酸酶的水(目录号 P1193)

1. 在一支无核酸酶污染的小离心管中加入:

RNA	2ug
引物	1ug
无核酸酶水补齐至	15ul

加热离心管到 70°C, 5 分钟, 这样可以打开模板的二级结构。然后立即在冰上冷却, 以避免重新形成二级结构。短暂离心, 使溶液归于管底。

2. 按以下顺序在复性的引物/模板管(即以上小离心管)中加入下列组分:

注意: 不要改变引物与 mRNA 的比例。

M-MLV 5XReaction Buffer	5ul
dATP,10mM	1.25ul
dCTP,10mM	1.25ul
dGTP, 10mM	1.25ul
dTTP, 10mM	1.25ul
重组 RNasin®核酸酶抑制剂	25units
M-MLV 反转录酶	<u>200units</u>
加无核酸酶水补齐至	25ul

3. 轻弹离心管混合溶液。若使用随机引物, 在 37°C 孵育 60 分钟进行反转录反应; 若使用其它引物(Oligo (dT)或基因特异引物), 则在 42°C 孵育 60 分钟进行反应。

4. 第二条链合成可使用您选择的操作方法, 也可参考: Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 8.64.

注意: M-MLV 反转录酶缓存液与许多下游应用相容。在进行第二链合成或 PCR 之前, 一般无需使用酚抽提及乙醇沉淀纯化合成的第一链 cDNA。