

产品目录号：
M5101
M5108
M9004

AMV 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/9pim510/9pim510.html>，本简明操作步骤电子版见 www.promega.com.cn

AMV 反转录酶 5×反应缓冲液 (M515A)：与 AMV 反转录酶一起提供的 5×反应缓冲液的组成为：250mM Tris-HCl (pH8.3, 25°C), 250mM KCl, 50mM MgCl₂, 2.5mM 亚精胺和 50mM DTT。

酶储存液：AMV 反转录酶 (AMV-RT) 储存液组成为：200mM 磷酸钾 (pH7.2, 4°C), 0.2% Triton X[®]-100, 2mM DTT 和 50% 甘油。

来源：酶纯化于禽成髓细胞瘤病毒颗粒。

储存条件：保存于-20°C。避免反复冻融，切忌暴露于温度频繁变化的环境。请注意查看产品标签上的过期日期。

活力单位定义：在 37°C 下，10 分钟内催化转化 1nmol 脱氧核苷酸为酸性可沉淀物质所需的酶量即一个活力单位。反应条件为：50mM Tris-HCl (pH8.3), 40mM KCl, 8.75mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.1mg/ml 乙酸化的 BSA, 1mM 放射性标记的 dTTP 和 0.25mM poly(A):oligo(dT)。请注意查看产品标签上的活力单位浓度。

注意：

1. AMV 反转录酶 5×缓冲液仅用于 cDNA 第一链的合成，它不含有脱氧核苷酸，因此不能替换 Promega 的 RiboClone AMV RT First-Strand 5×buffer (Part #C121A)，C121A 为 Universal RiboClone cDNA System (目录号 C4360) 中的一个组份，含有四种 dNTP。Promega 的 Access RT-PCR System (目录号 A1250) 是使用 AMV 反转录酶和 *Tfi* DNA 聚合酶，把反转录和 PCR 整合为一步而无须中间操作的试剂盒，其中的缓冲液与 AMV 反转录酶 5×反应缓冲液组份不同，所以这两种缓冲液也是不能互相替换的。
2. AMV 反转录酶 5×缓冲液不能用于 M-MLV 反转录酶。
3. 如果你将使用 *Taq* DNA Polymerase 于 PCR 反应，那么可以直接加入体积在 10ul 以内的本反转录反应混合物。如果你使用的是 GoTaq[®] DNA Polymerase (目录号 M3001) 或 PCR Master Mix (目录号 M7501) 那么可以直接加入 25ul 以内的本反转录反应混合物于 50ul PCR 体系中。

AMV 反转录酶简明操作步骤

使用说明

I. 描述

AMV 反转录酶 (AMV RT) 以 DNA、RNA 或 RNA:DNA 杂合体为模版催化 DNA 的合成。此反应需要引物 (DNA 引物效率高于 RNA 引物) 和 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 。此酶具有 RNase H 的活性。

AMV RT 的用途:

- cDNA 第一链的合成。
- RNA 测序。

II 标准应用

A. cDNA 第一链的合成

请使用者准备:

- dNTP mix (目录号 U1330 或 U1240)
- RNasin 重组的 RNA 酶抑制剂 (目录号 N2511)
- 焦磷酸钠, 40mM (预热至 42°C)
- Oligo (dT) (目录号 C1101) 或随机引物 (目录号 C1181)
- 无核酸酶的水 (目录号 P1193)
- EDTA (50mM)
- [α -32p] dCTP (> 400Ci/mmol, 10mCi/ml; Amersham, 目录号 PB10165)

以下操作基于 2ug RNA。在无核酸酶离心管中加入 RNA 样品后, 再加引物至终浓度为 0.5ug 引物/ug RNA, 总体积应 \leq 11ul。切勿改变引物与 RNA 模版的比率。将离心管置于 70°C 5 分钟, 然后置于冰上冷却 5 分钟, 短暂离心收集溶液于管底。

1. 按顺序加入下列组分:

AMV 反转录酶 5×缓冲液	5ul
dNTP 混合物	2.5ul
RNasin RNA 酶抑制剂	40 单位
焦磷酸钠, 40mM (预热至 42°C)	2.5ul
AMV 反转录酶	30 单位
加无 RNA 酶水至终体积	25ul

2. 轻弹离心管以混匀, 取出 5ul 此反应液于另一含有 2-5uCi [α -32p] dCTP 的离心管中。切勿将标记加入剩余的 20ul 反应液中。

注意: 推荐不要使用超过一周的 [α -32p] dCTP

3. 如果使用的是 oligo(dT) 那么于 42°C 孵育 60 分钟, 如果是随机引物请于 37°C 孵育。

4. 孵育后将离心管置于冰上, 并加 95ul 50mM 的 EDTA 与标记过的反应液中, 此时终体积为 100ul。可用此标记过的反应液做分析。

5. 用非标记的第一链反应液合成第二链 (见引文 4 和 5)。无须苯酚萃取或乙醇沉淀。

III 缓冲液和溶液的组分

dNTP mix

10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP 水溶液。
(由 100mM 储存液制备)