



HiFi V M-MLV (H-) Reverse Transcriptase

目录号： CW3374S(10000 U)

CW3374M (200 kU)

CW3374L (2000 kU)

保存条件： -30~-15℃保存，干冰运输。

产品内容

Component	CW3374S 10000 U	CW3374M 200 kU	CW3374L 2000 kU
HiFi V M-MLV (H-) Reverse Transcriptase (200U / μ L)	50 μ L	1 mL	10 mL
5 \times SuperRT Buffer	1 mL	10 mL	100 mL

产品简介

HiFi V M-MLV (H-) Reverse Transcriptase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 V M-MLV (H-) Reverse Transcriptase 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 V M-MLV (H-) Reverse Transcriptase在55℃表现出优良的逆转录活性（该酶最高可以用60℃做逆转录反应），针对复杂结构的RNA，提高逆转录反应温度可以明显提高cDNA的产率，此外，经过突变改造的HiFi V M-MLV (H-) Reverse Transcriptase，稳定性更加良好，可以合成最大15kb的cDNA。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℃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 μg的16S, 23S rRNA在37℃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-15℃以下环境中，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，如需要可单独向本公司订购，货号：CW0596。

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 V M-MLV (H-) Reverse Transcriptase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 V M-MLV (H-) Reverse Transcriptase (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，如需要可单独向本公司订购，货号：CW0596。

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1-15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℃及以下环境中长期保存。

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：

2. 将RNA模板、引物、dNTP Mix、SuperRT Buffer、HiFi V M-MLV (H-) Reverse Transcriptase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 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
RNase-Free Water	up to 15 μL	

3. 70 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 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，如需要可单独向本公司订购，货号：CW0596。

6. 轻轻吹打混匀，若反转录引物为Oligo-dT Primer或Specific Primer时，42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2分钟；若反转录引物为Random Primers，则25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10分钟。

7. 加入1 μL HiFi V M-MLV (H-) Reverse Transcriptase(200 U/ μL)，轻轻吸打混匀。55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30分钟。

8. 85 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 及以下环境中长期保存。