



## PCR 反应

1. 取 10% 第一链反应液 (2 $\mu$ l) 转移到合适的无菌薄壁 PCR 管中。注意：根据基因的表达丰度和所提取的 RNA 的质量可适当调整第一链反应液的加量，50 $\mu$ l 的 PCR 体系中可加入 2-10 $\mu$ l 模板。
2. 按次序加入下列试剂：
  - 5 $\mu$ l 10X PCR Buffer
  - 1 $\mu$ l 10mM dNTP mix
  - 1 $\mu$ l 10 $\mu$ M Primer #1 (用户自备)
  - 1 $\mu$ l 10 $\mu$ M Primer #2 (用户自备)
  - x $\mu$ l H<sub>2</sub>O (使反应总体积为 49  $\mu$ l)
  - 1 $\mu$ l Taq DNA polymerase
3. 扩增反应。根据用户引物的退火温和所扩增基因在原组织或细胞中的拷贝数，参考 Taq DNA polymerase 的技术参数，设定扩增条件。具体说明参见 Taq DNA 聚合酶说明书。通常循环 30-35 次。
4. DNA 扩增产物用 Agarose 电泳和 EB 染色观测。



地址：北京海淀区留学人员创业园

电话：010-62951781

传真：010-62951781

网址：[www.bioteke.com](http://www.bioteke.com)

Email: info@bioteke.com

## SupermoIII M-MLV Reverse Transcriptase

### 产品描述：

SupermoIII MMLV Reverse Transcriptase, 该酶是在普通 M-MLV 基础上经过多次定点突变缺失了原酶中 RnaseH 活性，同时增加了反转录酶的热稳定性和扩增活性。RNase H 能够降解 DNA/RNA 杂合体中的 RNA，因此在 cDNA 第一条链的合成反应中会降低 cDNA 的扩增长度；缺失了 RNase H 活性，反转录可以得到更长的 Supermo III M-MLV；同时由于引入特定的突变，增加了 Supermo III M-MLV 的扩增活性，使获得的 cDNA 更长。良好的耐热性能使该酶在反转录过程中可以有效克服模板 RNA 的二级结构，以及 GC 含量高的 RNA，-20 $^{\circ}$ C 保存

### 产品组成：

产品组成	PR6811	PR6812
supermo M-MLV (200U/ $\mu$ L)	10000U	50000U
5 $\times$ first-strand Buffer	1 mL	1 mL $\times$ 5

### 产品特点：

扩增活性高：能获得大于 13kb 的 cDNA 片段，适用于构建 cDNA 文库  
热稳定性好：最适反应温度 50 $^{\circ}$ C，可在 60 $^{\circ}$ C 下完成反转录  
RNaseH 活性低：适合合成长片段的 cDNA

### 适用范围：

第一链 cDNA 合成  
cDNA 文库构建  
一步法 RT-PCR  
引物延伸

3'和 5'RACE

### 产品来源:

重组 *E.coli* 菌株,含有从莫洛尼氏鼠中克隆的莫洛尼氏鼠白血病病毒逆转录酶基因。

### 活性单位:

1 单位活力定义为在 37°C、10min 内,以 polyA · poly(dT)<sub>12-18</sub> 作为模板-引物,将 1 nm dNTP 掺入到酸不溶物质所需的酶量。

### 操作流程1:

1. 在冰浴的试管中加入如下反应混合物:

Total RNA	0.1-5μg
Oligo(dT) <sub>18</sub> (50uM) or random primer (0.2μg/μl)	1μl
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	11μl

2. 轻轻混匀后,在70°C水浴5 min后,冰浴。

3. 将试管冰浴,再加入如下组分:

5×first-strand Buffer	4μl
RNase Inhibitor (40U/μl)	0.5μl
dNTP Mix(10mmol/L)	2μl
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	19μl

轻轻混匀后,在37°C水浴5 min;如果是随机引物,则在25°C水浴5 min

4. 轻轻混匀后离心3~5 秒。加入1μl supermoIII M-MLV (200U/μl),终体积为20μl。

5. 在PCR仪上进行如下操作:

①50°C, 60min

(如果采用随机引物则预先在25°C, 10 min, 然后50°C, 60min)。

②70°C, 10 min;

之后随即冰上冷却,得到的cDNA可以直接用于后续的PCR等反应,也可以-20°C冻存以备以后使用

### 快速操作流程2:

1. 在冰浴的试管中加入如下反应混合物

Total RNA	0.1-5μg
Oligo(dT) <sub>18</sub> (50uM) or random primer (0.2μg/μl)	1μl

5×first-strand Buffer	4μl
RNase Inhibitor (40U/μl)	0.5μl
supermoIII M-MLV	1μl
dNTP Mix(10mmol/L)	2μl
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	to 20μl

2. 在PCR仪上进行如下操作:

①50°C, 60min

(如果采用随机引物则预先在25°C, 10 min, 然后50°C, 60min)。

②70°C, 10 min;

之后随即冰上冷却,得到的cDNA可以直接用于后续的PCR等反应,也可以-20°C冻存以备以后使用