使用前请仔细阅读说明书　　版本号：202106

HI-MMLV Reverse Transcriptase Kit

货号：ER001　　规格：25T/50T/100T　　保存：-20℃

产品说明：

本品提供了所有的用于 cDNA 第一链合成的试剂，其中逆转录酶的 RNase H 活性较低，在 50℃下具有更高的热稳定性和更长的半衰期，可提供较其他逆转录酶更高的全长 cDNA 产量，能够利用起始 RNA 稳定地生成具有完整基因代表性的 cDNA，优化后的体系显著提高反应的灵敏性，避免假阴性结果。本品可获得代表起始 RNA 的高保真度的 cDNA，适用于灵敏度要求较高的实时荧光定量 RT-PCR 和芯片实验。本品中 HI-MMLV Reverse Transcriptase 的浓度为 200U/μl。

产品内容：

试剂组成	ER001-01 (25T)	ER001-02 (50T)	ER001-03 (100T)
HI-MMLV Reverse Transcriptase (200U/μl)	25μl	50μl	100μl
5x HI-MMLV Buffer (Mg^{2+} plus)	125μl	250μl	500μl
10x HI-MMLV Solution I	60μl	120μl	240μl
RNase Inhibitor (40U/μl)	25μl	50μl	100μl
RNase-Free ddH_2O	1ml	1ml	1ml*2
Oligo $(dT)_{16}$ Primer (10μM)	60μl	120μl	240μl
Random Primer (10μM)	60μl	120μl	240μl
dNTP Mixture (25mM each)	12μl	25μl	50μl

储存条件：

-15℃至-25℃保存一年，避免反复冻融，使用时注意标签上的有效时间。

活性单位定义：

以 Po 为模板/引物 ly (rA)·Oligo (dT)，在 37℃、10min 条件下，掺入 1nmol 的[3H]dTTP 所需要酶量定义为 1 个活性单位（U）。

产品应用：

- First-Strand cDNA 的合成；
- cDNA Probe 的制备；
- 一步法 RT-PCR 反应；
- Real Time PCR 反应和芯片实验。

操作步骤:

First-Strand cDNA 合成的实验操作方法：

1、在无菌的 RNase -free 的离心管配制以下体系：

1）2μl Random Primer (10μM)或 2pmol 基因特异引物或 2μl Oligo $(dT)_{16}$ Primer (10μM)。

2）10pg-5μg 总 RNA 或 50-500ng mRNA；0.4μl dNTP Mixture（dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 各 25mM）。

3）补 RNase-Free ddH_2O 到 10μl。

2、65℃保温 5min 后迅速在冰上冷击至少 1min 以上。

3、离心数秒钟使模板 RNA/引物的变性溶液聚集于离心管底部。

4、在上述离心管中配制下列逆转录反应液。

试剂名称	使用量	终浓度
上述模板 RNA/引物的变性溶液	10μl	-
5x HI-MMLV Buffer (Mg^{2+} plus)	4μl	1×
10x HI-MMLV Solution I	2μl	1×
RNase Inhibitor (40U/μl)	1μl	2U/μl
HI-MMLV Reverse Transcriptase (200U/μl)	1μl	10U/μl
RNase-Free ddH_2O	Up to 20μl	-

5、轻弹离心管，50℃保温 30-60min，或随机引物的反应在 37℃保温 60min，其他引物的反应在 37℃保温 60min。

6、80℃保温 15min 后冰上冷却，得到的 cDNA 溶液可直接用于 2nd-Strand cDNA 的合成或者 PCR 扩增等，PCR 扩增时 cDNA 溶液的使用量建议使用 10μl。

注意事项:

1. 当同时需要进行数次反应时，应先配制各种试剂的混合液（Master Mix；其中包括 RNase Free ddH_2O、Buffer、酶等），然后再分装到每个反应管中。这样可使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失，避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作或实验之间产生的误差。

2. HI-MMLV Reverse Transcriptase (200U/μl)在使用前要小心地离心收集到反应管底部。由于酶保存液中含有 50%的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。同时，要使用精确、量程适合的移液枪，并且不要使枪头插入液面过深，否则会因枪头壁粘着造成损失，而使酶量不足。

3. 5x HI-MMLV Buffer (Mg^{2+} plus)在使用前需振荡混匀，轻轻离心后使用。

4. 分装试剂时务必使用新的枪头，以防止样品间污染。