

BeyoRT™ III M-MLV反转录酶

产品编号	产品名称	包装
D7176S	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	10KU
D7176M	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	50KU
D7176L	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	200KU

产品简介:

- 碧云天生产的 BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶, 即 BeyoRT™ III M-MLV reverse transcriptase, 是一种经过改造和优化的快速高效(短至 10min 完成反转录)、热稳定(高达 55 ℃)、高精度度、产物超长(长达 12kb)的反转录酶, 具有正常的依赖于 RNA 或 DNA 模板的 DNA 聚合酶活性, 能够以 RNA 或 DNA 为模板, 在引物存在的情况下进行互补 DNA 链的合成, 即可以进行 cDNA(complementary DNA)的第一链合成。同时本反转录酶保留了 RNase H 活性, 能选择性剪切 RNA 和 DNA 杂合双链中的 RNA, 有利于后续 cDNA 第二链的合成。
- 本产品是最常用的优质反转录酶之一, 广泛用于获得总 RNA 或 mRNA 后 cDNA 第一条链的合成, 后续可以用于 PCR、real-time PCR 也称定量 PCR(quantitative PCR, qPCR)、cDNA 的第二链合成以及 cDNA 文库的构建, 尤其是逆转录所得目的基因的克隆等。BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶还可以通过反转录用于 DNA 探针的荧光、生物素、地高辛或同位素标记等, 也可以通过引物延伸(primer extension)来分析和研究 RNA。
- M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus), 也称 MMLV 或 M-MuLV; 反转录酶(reverse transcriptase)也称逆转录酶或 RT 酶。
- 本产品反转录快速高效, 普通反转录仅需 10min。实测小于 3kb 的片段, 42 ℃ 反转录 10min 即可完成, 与反转录 60min 相比无显著差别。大于 3kb 的片段, 特别是大于 6kb 的片段, 推荐反转录 60min, 以获得最佳的反转录效果。
- 本产品反转录产物长度超长。本产品经测试可以轻松完成长度为 8 kb 以下基因的反转录(参考图 1), 反转录的最大长度可以达到 12 kb。

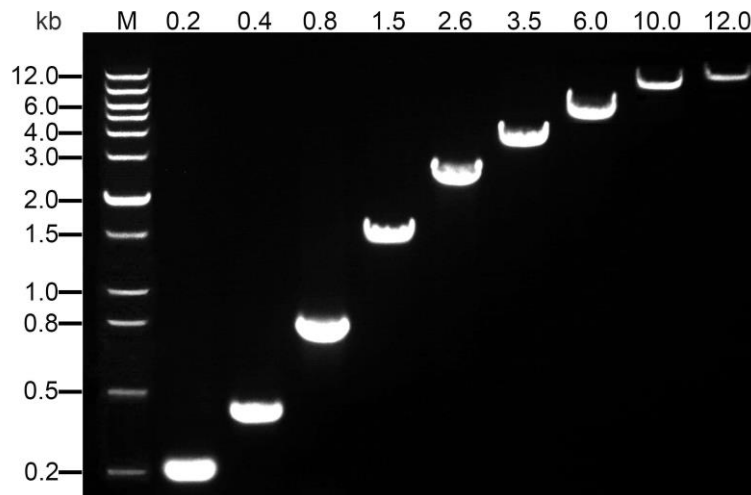


图1. 使用BeyoRT™ III M-MLV反转录酶反转录总RNA后, 对于不同长度的cDNA进行PCR扩增后的电泳效果图。图中可见 0.2-12kb的cDNA可以非常高效地被反转录。

- 本产品热稳定性好, 反转录效率高。本产品最适反应温度为 42 ℃, 当温度达到 50 ℃ 时仍具有很高活性, 对于长度较短的 cDNA 反转录, 温度达到 55 ℃ 时也可获得较高产量的 cDNA。高温反转录对于高 GC 含量 RNA 的反转录, 能有效减少二级结构, 提升反转录效率。本产品反转录速度快, 6kb 以下的 cDNA 反转录只需 0.5h 即可完成, 3kb 以下的 cDNA 反转录 10min 即可完成(参考图 2)。

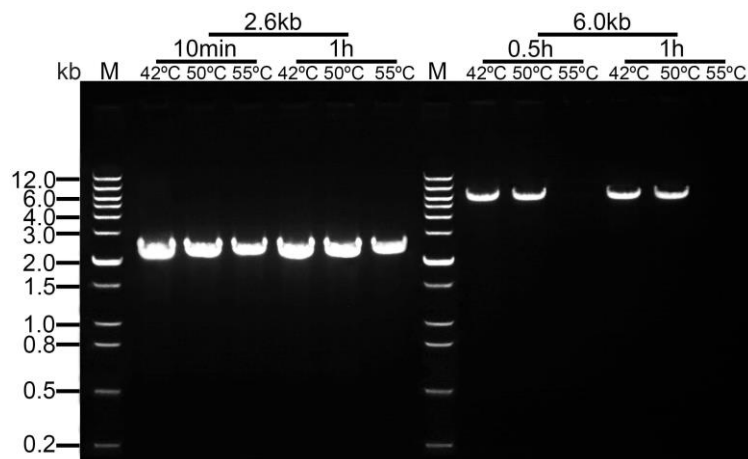


图 2. BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶在不同温度反应不同时间的反转录效果。从 HEK293T 细胞抽提获得的总 RNA 2µg，在 20µl 反转录体系中按照图中所示温度、时间进行反转录。反转录后取 1µl 反转录产物进行目的基因(2.6kb 的 YWHAZ 基因和 6.0kb 的 ADAR1 基因)的 PCR 扩增和电泳。

- 本产品性价比高。BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶是一种大肠杆菌重组高表达的反转录酶，由于其表达量非常高，大大提高了本产品的性价比。本反转录酶为表达含有从 Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase 基因克隆的 *pol* 基因，并进行了多个突变优化以提高其热稳定性、反转录效率、反转录长度和表达量。
- 酶活性定义：One unit of the enzyme incorporates 1 nmol of dTTP into acid-precipitable material in 10 min at 37 °C using poly(A)•oligo(dT)₁₂₋₁₈ as template-primer。反应体系为 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5mM [³H]-dTTP and 0.4 mM polyA•oligo(dT)₁₂₋₁₈。
- 纯度：不含 DNA 内切酶、外切酶和磷酸酯酶和 RNA 酶，可以满足常规反转录合成 cDNA 第一条链等的需要。
- 酶储存溶液：20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% (v/v) NP-40 and 50% (v/v) glycerol。
- 失活或抑制：80 °C 孵育 10 分钟可以导致 BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶失活；EDTA、EGTA 等螯合剂、无机磷酸盐或焦磷酸盐以及聚氨(polyamine)对 BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶有抑制作用。
- 本产品中 M-MLV 反转录酶的浓度为 200U/µl，用于体积为 20µl 的反转录体系时，本试剂盒的不同包装足够分别进行 50 次、250 次和 1000 次反转录反应。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D7176S-1	BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶	50 µl
D7176S-2	Reaction Buffer (5X)	0.3ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7176M-1	BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶	250 µl
D7176M-2	Reaction Buffer (5X)	1.2ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7176L-1	BeyoRT™ III M-MLV 反转录酶	1ml
D7176L-2	Reaction Buffer (5X)	5ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20 °C 保存。

注意事项：

- 对于 GC 含量比较高的 RNA 的反转录，产品的使用说明中给予了特别说明，请予以关注。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. cDNA 第一条链的合成(First-stand cDNA Synthesis):
 - a. 参考如下表格中设置的 20µl 反转录体系(RNase Inhibitor (R0102)和 dNTP mix (D7373)可从碧云天订购):

模板(右侧3种任选其中一种)	Total RNA	0.1ng-5μg
	或poly(A) RNA/mRNA	10pg-0.5μg
	或specific RNA	0.01pg-0.5μg
引物(右侧3种任选其中一种)	Oligo(dT) ₁₈ primer	0.5μg (或100pmol)
	或 Random Hexamer primer	0.2μg (或100pmol)
	或 gene-specific primer	15-25pmol
DEPC-treated Water	-	To 13.7μl*
选择性步骤: 如果模板RNA的GC含量较高(例如大于55%)或者有比较严重的二级结构, 混匀后微离心以把液体沉降至管底, 65 °C 孵育5min, 随后立即置于冰上冷却, 以打开RNA中一些比较稳定的二级结构。		
Reaction Buffer (5X)	-	4μl
RNase Inhibitor (40U/μl)	-	0.5μl
dNTP Mix (25mM each)	-	0.8μl**
BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	-	1μl
总体积		20μl

*To 13.7μl表示加入DEPC-treated Water至最终体积为13.7μl。

**dNTP浓度不同时使用的体积需作适当调整, 此时DEPC-treated Water的用量需适当调整。

- b. 轻轻混匀(用移液器轻轻吹打混匀或用涡旋混合器在最低速度轻轻混匀), 随后离心沉淀液体。
 - c. 如果使用Oligo(dT)₁₈或基因特异性引物, 42 °C 孵育10-60 min。如果使用random hexamer(随机六聚体)作为引物, 先在25 °C 孵育10min, 随后在42 °C 孵育10-60 min。反转录3kb以下的cDNA, 反转录10min即可, 反转录3-6kb的cDNA, 反转录30min即可, 而6kb以上的cDNA推荐反转录60min。当使用random hexamer(随机六聚体)作为引物, 并且后续用于qPCR时, 后续检测任何长度的基因, 均反转录10min就足够了。**注意:** 对于GC含量较高或二级结构比较严重的模板RNA, 可以50 °C 反转录60min, 以充分利用本产品50 °C时仍有良好的反转录酶活性这一特点, 在较高温度进行反转录可以有效减少二级结构的干扰。
 - d. 80 °C 孵育10 min以失活BeyoRT™ III M-MLV反转录酶并终止反转录反应。**说明:** 对于5kb以上的长片断cDNA不推荐采用加热的方法失活反转录酶, 该方法易导致部分长片断DNA被剪切, 此时可考虑酚氯仿抽提或柱纯化方法。
 - e. 反转录产物可以直接用于后续的PCR反应等, 也可以-20 °C 冻存以备以后使用。用于后续PCR反应时, 如果PCR的反应体系为20μl和50μl, 则推荐相应地使用0.8μl和2μl反转录产物。
2. 引物延伸、探针标记等其它用途请自行参考M-MLV反转录酶的相关文献资料进行。

常见问题:

1. 总RNA反转录产物电泳观察不到。
 - a. 反转录产物由于是从模板反转录而获得, 而模板的量本身比较低, 反转录的量通常还要少于模板量, 并且总RNA的反转录产物大小很不均匀, 因此通常总RNA的反转录产物直接电泳观察是观察不到的。
2. 反转录产物通过PCR扩增没有特异性条带。
 - a. PCR扩增没有获得特异性条带时建议先使用actin、GAPDH等作为内参进行PCR扩增, 看是否可以成功扩增。如果可以成功, 则说明PCR扩增体系没有问题, 此时通常是目的基因的引物设计欠佳, 当然也有可能是反转录产物质量欠佳。如果内参不能被很好地扩增, 则有可能PCR体系存在问题或反转录产物质量欠佳。
 - b. 模板RNA发生了降解。哺乳动物细胞或组织的总RNA琼脂糖电泳后应该可以看到清晰的18S和28S rRNA条带, 并且28S rRNA和18S rRNA的亮度比例应该大于等于2.0。如果比例小于2.0, 则提示总RNA发生了显著的降解, 最好能重新制备总RNA样品。避免RNA降解的主要方法是, 严格进行RNA的相关操作, 包括带洁净手套、戴一次性口罩、在洁净环境中抽提或制备RNA, 以尽量避免RNase污染。
 - c. 模板RNA的纯度偏低。在提取纯化RNA的过程中, 残留在溶液中的一些成分如苯酚、SDS、EDTA、胍盐、磷酸、焦磷酸、多胺、亚精胺等会抑制反转录酶活性。对RNA样品进行柱纯化, 或者进行沉淀、洗涤和再溶解, 通常可以有效去除残留的污染物。通常选择使用碧云天的BeyoZol或Trizol抽提获得的总RNA完全可以满足反转录反应的需要。
 - d. 反转录反应的模板量不足。在抽提获得总RNA后, 在进行一些精细的定量检测时通常会进行DNase I消化, 以充分去除可能的残留的DNA的干扰。DNase I进行热失活时, 需要加入EDTA至终浓度为2.5mM, 否则RNA在没有螯合剂的情况下, 在加热过程中容易被水解, 从而导致模板量不足。此外, 扩增特定基因时, 需要先查询该基因的组织分布特点, 利用其高表达的组织进行目的基因的反转录和克隆。用该基因丰度极低的组织或细胞样品进行反转录和PCR扩增, 通常会由于模板量过少而PCR扩增失败。
 - e. 没有使用适当的反转录引物。对于细菌RNA和不含poly(A)尾巴的RNA, 要用random hexamer引物代替Oligo(dT)₁₈引物。使用基因特异性反转录引物时, 需要确保基因特异性引物设计合理正确。
 - f. 如果RNA模板富含GC或容易形成二级结构, 此时可以考虑把反转录温度提高到45-55 °C。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7153	BeyoRT™ M-MLV反转录酶	2000U

D7159	BeyoR™ M-MLV反转录酶(RNase H-)	2000U
D7160S	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	10KU
D7160M	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	50KU
D7160L	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	200KU
D7166	BeyoRT™ cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	10次
D7168S	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	20次
D7168M	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	100次
D7168L	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	500次
D7170S	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	20次
D7170M	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	100次
D7170L	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	500次
D7172	cDNA第二链合成试剂盒	10次
D7176S	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	10KU
D7176M	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	50KU
D7176L	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	200KU
D7178S	BeyoRT™ III cDNA第一链合成试剂盒	20次
D7178M	BeyoRT™ III cDNA第一链合成试剂盒	100次
D7178L	BeyoRT™ III cDNA第一链合成试剂盒	500次
D7180S	BeyoRT™ III cDNA合成试剂盒(with gDNA EZEraser)	25次
D7180M	BeyoRT™ III cDNA合成试剂盒(with gDNA EZEraser)	100次
D7180L	BeyoRT™ III cDNA合成试剂盒(with gDNA EZEraser)	500次
D7182S	BeyoRT™ III cDNA第一链合成预混液(5X)	25次
D7182M	BeyoRT™ III cDNA第一链合成预混液(5X)	100次
D7182L	BeyoRT™ III cDNA第一链合成预混液(5X)	500次
D7185S	BeyoRT™ III cDNA合成预混液(5 X, with gDNA EZEraser)	25次
D7185M	BeyoRT™ III cDNA合成预混液(5 X, with gDNA EZEraser)	100次
D7185L	BeyoRT™ III cDNA合成预混液(5 X, with gDNA EZEraser)	500次
D7205	Taq DNA Polymerase	200U
D7207	Taq DNA Polymerase	1000U
D7216	Pfu DNA Polymerase	200U
D7217	Pfu DNA Polymerase	1000U
D7218	BeyoTaq DNA Polymerase	200U
D7219	BeyoTaq DNA Polymerase	1000U
D7226	GC-rich PCR Buffer(4种套装)	共2ml
D7228	2X PCR Master Mix	400次
D7232	PCR Kit with Taq	400次
D7233	PCR Kit with Taq	2000次
D7237	PCR Kit with BeyoTaq	400次
D7251	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	400次
D7255	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	400次
D7259	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	400次
D7371	dNTP Mixture(2.5mM each)	1ml
D7373	dNTP Mixture(25mM each)	250µl
R0011	Beyozol(总RNA抽提试剂)	100ml
R0016	Trizol(总RNA抽提试剂)	100ml
R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
R0102	RNase Inhibitor	2000U
ST036	DEPC	10g

使用本产品的文献:

1. Li J,Xiang X,Xu H,Shi Y.Cilostazol Promotes Angiogenesis and Increases Cell Proliferation After Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Through a cAMP-Dependent Mechanism.Cardiovasc Eng Technol. 2019 Dec;10(4):638-647.

