



HiFi V M-MLV(H-) Reverse Transcriptase (Glycerol-free)

HiFi V M-MLV(H-) 逆转录酶（无甘油）

目录号：CW3353S (10000U)

CW3353M (200kU)

CW3353L (2000kU)

保存条件： -20 ±5℃保存，干冰运输，避免反复冻融。

产品内容

Component	CW3353S 10000U	CW3353M 200kU	CW3353L 2000kU
HiFi V M-MLV(H-) Reverse Transcriptase (Glycerol-free) (200U /μL)	50μL	1mL	10mL
5×SuperRT Buffer	1mL	10mL	100mL

产品简介

HiFi V M-MLV(H-) Reverse Transcriptase (Glycerol-free)是HiFi V M-MLV(H-) Reverse Transcriptase (CW3374) 的无甘油版本，是通过对突变的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-)逆转录酶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-)逆转录酶能在55°C合成第一条链cDNA，提供更高的特异性，稳定性强，可以合成最大12kb的cDNA，cDNA产量高。适用于第一链cDNA的合成、RT-PCR、RT-qPCR以及全长cDNA文库的构建以及冻干RT-PCR产品的应用等。本品不含有冻干赋形成分，应用于冻干制品时可根据需求自定义添加。

活性定义

以Poly (A) 为模板，oligo (dT) 为引物，在37°C条件下，10分钟内催化掺入1nmol的dTTP所需酶量定义为一个活性单位(U)。

质量控制

200U的本酶和1 μ g的16S, 23S rRNA在37°C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°C处理12小时，并在120°C下高压灭菌30分钟后使用，或者将玻璃器皿在180°C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-20°C，避免反复冻融。
4. 若起始RNA的量小于50ng，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：10ng-5 μ g总RNA可建立20 μ L反应体系，如果总RNA量大于5 μ g，请按比例扩大反应体系。

a) 逆转录操作步骤：

1. 将RNA模板、引物、dNTP Mix、5 \times SuperRT Buffer、HiFi V M-MLV(H-) (Glycerol-free)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 μ L。

试剂	20 μ L 反应体系	终浓度
dNTP Mix, 2.5mM Each	4 μ L	500 μ M Each
Oligo-dT Primer, 100 μ M 或 Random Primers, 50 μ M 或 Specific Primer, 10 μ M	1 μ L	
RNA Template	X μ L	1ng-5 μ g
5 \times SuperRT Buffer	4 μ L	1 \times
HiFi V M-MLV(H-) (Glycerol-free) (200U / μ L)	0.5-1 μ L	
RNase-Free Water	up to 20 μ L	

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 $^{\circ}$ C孵育1-30分钟，85 $^{\circ}$ C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，或在-20 $^{\circ}$ C保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-80 $^{\circ}$ C保存。cDNA应避免反复冻融。

b) 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：

1. 将RNA模板、引物、dNTP Mix、5 \times SuperRT Buffer、HiFi V M-MLV(H-) (Glycerol-free)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 μ L。

试剂	15 μ L 反应体系	终浓度
dNTP Mix, 2.5 mM Each	4 μ L	500 μ M Each
Oligo-dT Primer, 100 μ M 或 Random Primers, 50 μ M 或 Specific Primer, 10 μ M	1 μ L	
RNA Template	X μ L	1ng-5 μ g
RNase-Free Water	up to 15 μ L	

3. 70 $^{\circ}$ 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 μ L 5 \times SuperRT Buffer。
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。
6. 轻轻吹打混匀，若反转录引物为Oligo-dT Primer或Specific Primer时，42 $^{\circ}$ C孵育2分钟；若反转录引物为Random Primers，则25 $^{\circ}$ C孵育10分钟。
7. 加入1 μ L HiFi V M-MLV(H-) (Glycerol-free) (200U/ μ L)，轻轻吸打混匀。55 $^{\circ}$ C孵育50分钟。
8. 85 $^{\circ}$ 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，或在-20 $^{\circ}$ C保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-80 $^{\circ}$ C保存。cDNA应避免反复冻融。