

Version 2

Cat No. AG11705

# *Evo M-MLV* 反转录试剂盒 (含去除 gDNA 试剂, 用于 qPCR)

## *Evo M-MLV* RT Kit with gDNA Clean for qPCR

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



## ➤ 产品概述

本产品是利用 *M-MLV* (*Moloney Murine Leukemia Virus*) 反转录聚合酶的反转录试剂盒，反转录合成 cDNA 产物可直接用于 qPCR 检测。基因组 DNA 会对 cDNA 的定量分析造成影响，本产品使用了具有较强 DNA 分解活性的 gDNA Clean Reagent，通过 42°C、2 min 即可除去基因组 DNA，处理后的样品可以直接进行后续反转录反应合成 cDNA，再通过定量 PCR 进行基因分析，适用于检测不含内含子或者两个外显子所跨内含子过小的目的基因。本产品提供了 2 种引物 Oligo dT (18T) Primer (50 μ M) 和 Random 6 mers Primer (400 μ M)，方便客户根据实验调整引物浓度。使用本产品合成得到的 cDNA 适用于嵌合法和探针法 qPCR 分析。

*Evo M-MLV* 反转录试剂盒 II (含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR) (Code.AG11711) 是在本制品的基础上，将引物 Oligo dT (18T) Primer 与 Random 6 mers Primer 的用量进行优化，配制成 RT Primer Mix，方便客户使用，减少加样带来的误差。

## ➤ 产品组成

组分名称	AG11705 ( 100 rxns / 20 μ l )
gDNA Clean Reagent	100 μ l
5X gDNA Clean Buffer	200 μ l
<i>Evo M-MLV</i> RTase Enzyme Mix <sup>*1</sup>	100 μ l
5X RTase Reaction Buffer Mix I <sup>*2</sup>	400 μ l
Oligo dT (18T) Primer (50 μ M)	100 μ l
Random 6 mers Primer (400 μ M)	100 μ l
RNase free water	1 ml x 2 pc

\*1: 含有 RNase Inhibitor。

\*2: 含有 dNTP。

## ➤ 保存

保存温度：-20°C

运输温度：干冰或者-20°C冰袋

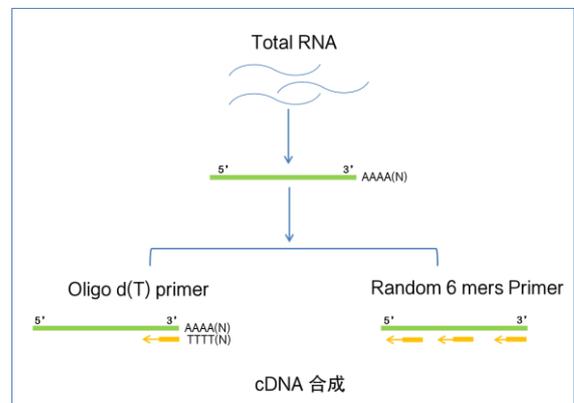
## ➤ 产品优势

1. 含有基因组 DNA 去除试剂 gDNA Clean Reagent，能够快速去除 RNA 模板中混有的基因组 DNA。
2. 试剂盒中分别配有 OligodT (18T) Primer (50 μ M)和 Random 6 mers Primer (400 μ M)，可根据实际情况选择不同的引物进行反转录，亦可根据需要调整引物浓度。
3. 本产品反转得到的 cDNA 同时可以适用于 SYBR 法和探针法 qPCR 分析。

## ➤ 实验原理

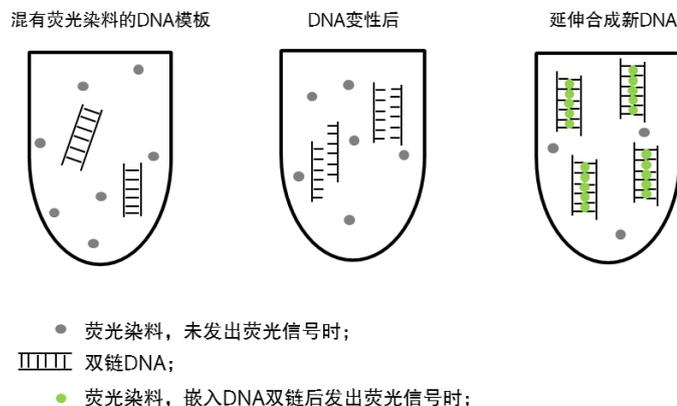
### 1. 反转录的原理

反转录是以 RNA 为模板，通过加入引物和反转录酶合成 cDNA 的过程，其中随机引物 Random Primer 适用于长的或具有发卡结构的 RNA 反转录，Oligo dT Primer 适用于有 PolyA 尾的 RNA 反转录。已知目的基因时，也可以使用 Specific Primer 作为反转录引物，对模板 RNA 进行反转录，合成得到 cDNA。如右图所示：



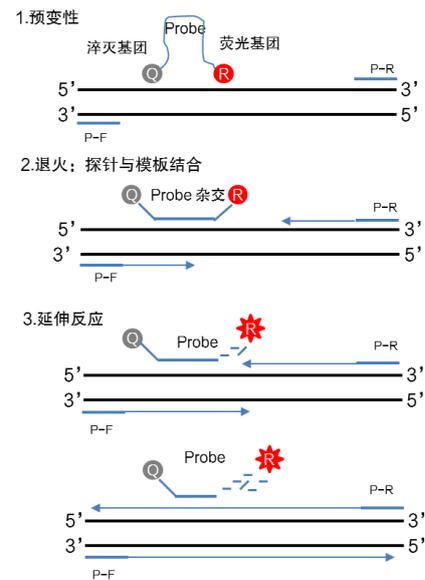
### 2. qPCR 反应原理

SYBR® Green I 荧光染料嵌合法利用 SYBR® Green I 与双链 DNA 结合后发出荧光的原理，首先将荧光染料 SYBR 加入 PCR 反应液中，在 PCR 扩增的延伸过程中，SYBR® Green I 可以嵌合到双链 DNA 双螺旋小沟区域并发出荧光，此时通过检测反应进程中的荧光信号值，达到对靶标基因进行定性/定量分析的目的。



探针法是通过检测反应液的荧光信号值，从而检测 PCR 产物的增量。荧光探针检测所用的探针在 5' 端标记有荧光物质(如: FAM), 3' 端标记有淬灭物质(如: BHQ), 当探针保持完整时,5' 端荧光报告基团发射的荧光受 3' 端淬灭基团淬灭,不能发出荧光信号;但是当探针被分解后,5' 端荧光报告基团与 3'端淬灭基团分离, 释放荧光信号。

在 PCR 反应过程中,退火时荧光探针会与待检测模板杂交;延伸时, Taq DNA 聚合酶的 5'-3'外切酶活性可以分解杂交的荧光探针,使得 5'端荧光报告基团游离出来,进而释放荧光信号。通过检测反应体系中的荧光信号强度,达到对目的基因进行定量分析的目的。



## ► 使用前注意事项

- gDNA Clean Reagent 与 *Evo M-MLV* RTase Enzyme Mix 甘油浓度较高, 使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部, 减少损失, 并用移液枪轻柔吸打混匀(避免起泡), 然后再进行使用。
- 需要同时进行多个样本检测时, 应先配制各种试剂的混合液, 然后分装到每个反应管中。
- 所有反应混合液需要在冰上配制。
- cDNA 产物适用于定量 PCR 反应, 不适用于长片段基因调取, 如有需要, 可选用本公司其他相关产品。
- 选用 SYBR 法和探针法进行实验时需要注意反转录反应中 Total RNA 的用量。
- 本品是由 RNA 制备 cDNA 的反转录试剂盒, 进行反转录反应时需要注意防止 RNase 污染, 需要使用灭菌的器具, 操作过程中要避免说话, 且需要穿戴实验服、一次性手套等防止 RNA 被污染或降解。

## ► 实验前准备

1. PCR 仪 (或 37°C、42°C 水浴和 85°C 加热块)
2. RNase free 1.5 ml 离心管、PCR 管
3. 冰浴或冰盒

#### 4. 移液器、枪头 (RNase free)

### ➤ 操作步骤

使用本试剂盒进行反转录时主要包括 2 个步骤：去除基因组 gDNA、反转录反应。如需进行下一步 qPCR 反应，可配合本公司定量相关产品进行使用。操作如下：

#### 1) 去除基因组 DNA。按照下表配制好反应液，进行基因组 DNA 去除反应。

组分名称	加入量
gDNA Clean Reagent	1 $\mu$ l
5X gDNA Clean Buffer	2 $\mu$ l
Total RNA <sup>*1</sup>	-
RNase free water	up to 10 $\mu$ l

反应条件：42 °C    2 min  
                   4 °C    -

\*1: RNA 量可根据需要添加。在 20  $\mu$ l 反转录体系中，使用 SYBR 法进行 qPCR 扩增时，最多使用 1  $\mu$ g 总 RNA；使用探针法进行 qPCR 扩增时，最多使用 2  $\mu$ g 总 RNA。

2) 反转录反应。配制反转录反应液，置于 PCR 仪进行变性、退火反应。（注：配制反转录反应液时，为了保证反应液配制的准确性，可将各组分先配制为 Master Mix，再分装到反应管中，最后加入 RNA 样品。反转录反应体系可以根据需要相应调整体积。

组分名称	加入量	
步骤 1 反应液	10 $\mu$ l	
<i>Evo M-MLV</i> RTase Enzyme Mix	1 $\mu$ l	} *2
Oligo dT (18T) Primer (50 $\mu$ M) <sup>*1</sup>	1 $\mu$ l	
Random 6 mers Primer (400 $\mu$ M) <sup>*1</sup>	1 $\mu$ l	
5X RTase Reaction Buffer Mix I	4 $\mu$ l	
RNase free water	3 $\mu$ l	
Total	20 $\mu$ l <sup>*3</sup>	

反应条件：37 °C<sup>\*4</sup>    15 min  
                   85 °C    5 sec  
                   4 °C    -

\*1: 如果不使用引物混合物，而选择单独引物，引物使用量如下：

Oligo dT (18T) Primer——50 pmol / 20  $\mu$ l 反应体系

Gene Specific Primer——5 pmol / 20  $\mu$ l 反应体系

\*2: 配制反转录反应时, 这几种溶液可以预先配制成 Master Mix, 再分装 10 μl 到上述步骤 1 反应液中。如不配制 Master Mix, **向步骤 1 反应液中添加试剂顺序**: RNase free water、5X RTase Reaction Buffer Mix I, 混合均匀, 目的是使得 gDNA Clean Reagent 活性受到充分抑制, 再添加 Primer、*Evo M-MLV* RTase Enzyme Mix 溶液, 轻柔混匀后进行反转录反应。

\*3: 反转录反应体系可以根据需要相应调整。

\*4: 当使用 Gene Specific Primer 时, 可以将反应条件设置为 42°C 15 min; 如果为降低非特异性扩增, 可将反应温度升高到 50°C。

### 3) 定量 PCR 分析

经上述反转录过程得到的 cDNA 可以直接进行定量 PCR 分析。以本公司 SYBR® Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit ( Code. AG11701 ) 为例, 具体操作如下:

( 以 ABI 7500 Real-Time PCR System 为例 )

组分名称	20 μl 体系	50 μl 体系
2X SYBR® Green <i>Pro Taq</i> HS Premix	10 μl	25 μl
cDNA <sup>*1</sup>	2 μl	5 μl
Primer F (10 μM) <sup>*2</sup>	0.4 μl	1 μl
Primer R (10 μM) <sup>*2</sup>	0.4 μl	1 μl
ROX Reference Dye (4 μM) <sup>*3,4</sup>	0.4 μl	1 μl
RNase free water	Up to 20 μl	Up to 50 μl

\*1: 定量 PCR 反应体系中, cDNA 原液使用体积不要超过定量 PCR 反应总体积的 10%。

\*2: 引物通常使用终浓度为 0.2 μM, 当反应结果差时可以在 0.1 - 1.0 μM 范围内调整。

\*3: 请按照不同仪器推荐的反应体系配制反应液。如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准, 请按照仪器推荐量添加。

\*4: 若不需要使用 ROX 的 PCR 仪, ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。

#### 两步法 qPCR 扩增程序<sup>\*1</sup>:

	温度	时间	循环数
Step 1	95°C	30 sec <sup>*2</sup>	1
Step 2	95°C	5 sec	40
	60°C	30 sec <sup>*3</sup>	
Step 3	Dissociation stage		

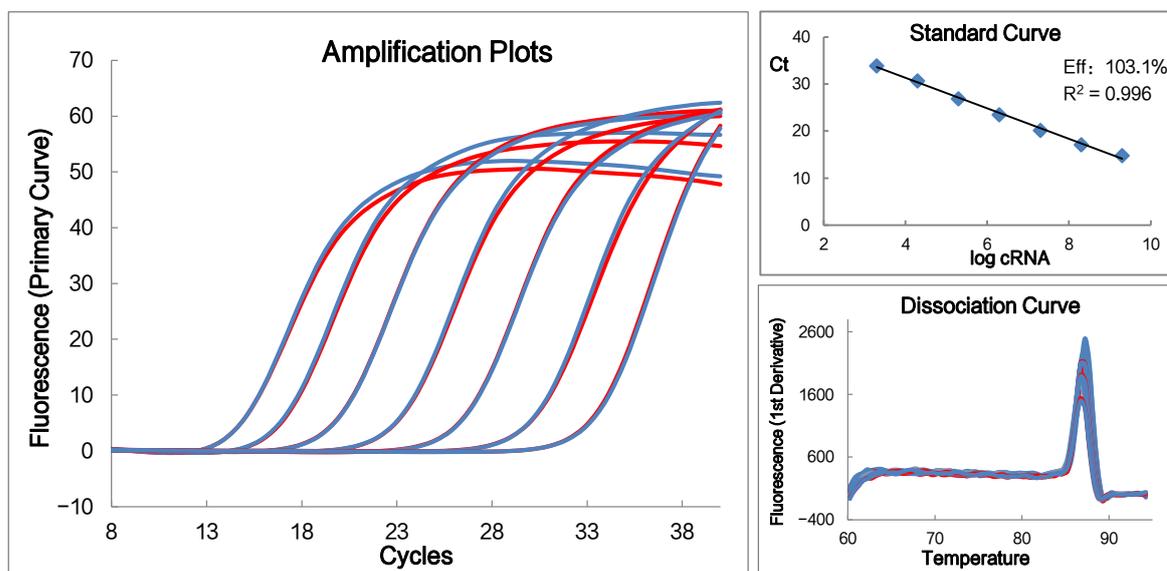
\*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件; 如果引物 Tm 值较低, 导致两步法扩增效率较差, 可采用三步法进行 PCR 扩增。

\*2: 预变性温度通常设定为 30 sec, 如果模板变性困难, 可以延长预变性时间至 1~2 min。

\*3: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增延伸反应条件设定为 60°C、30sec 时可以满足要求; 如需提高反应特异性, 可适当提高退火延伸温度; 如需提高扩增效率, 或 PCR 扩增产物较长, 则可将反应延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。

## 实验例

- 1、向小鼠肝脏 Total RNA ( 分别为 2 μg、200 ng、20 ng、2 ng、200 pg、20 pg、2 pg、0 pg ) 分别加入 200 ng 的小鼠基因组 DNA, 使用本试剂盒进行基因组 DNA 去除反应, 去除基因组 DNA 后进行反转录实验, 并以此 cDNA 为模板, 取 2 μl 的 cDNA 原液, 用 SYBR® Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit (Code. AG11701) 进行 qPCR 扩增检测小鼠的 *GAPDH* 基因。



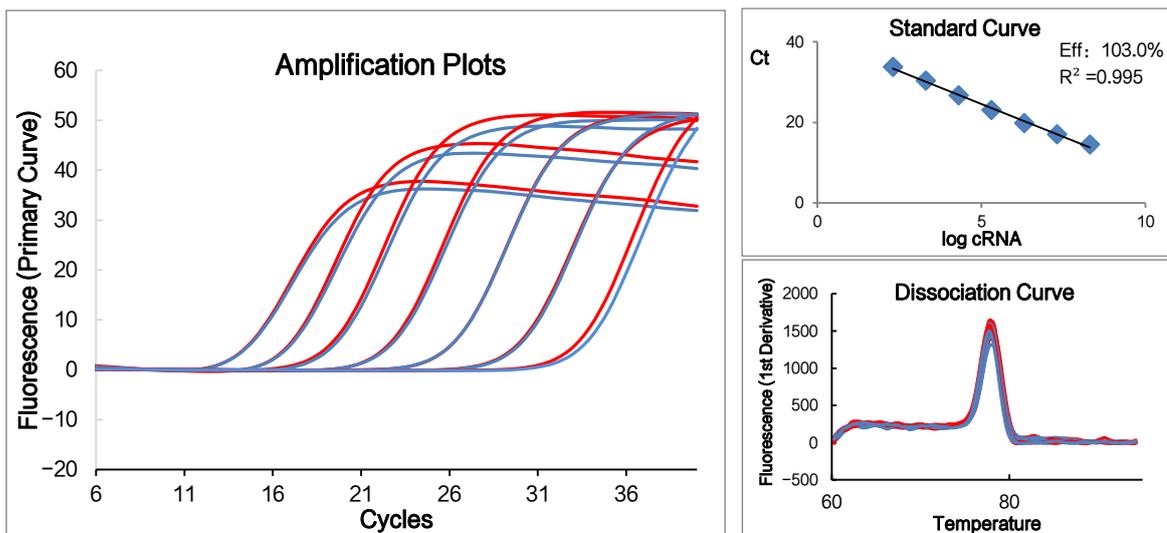
结果如上图所示: 1、工作曲线  $R^2=0.996$ , 扩增效率 103.1%。

2、不加 RNA 但添加 gDNA 样品, Ct 值在 35 cycles 以内没有检出。

3、本制品的反转效率高, 能在宽广的模板范围内进行准确的定量, 2 μg ~ 2 pg Total RNA 反转录获得的 cDNA 扩增曲线呈现良好的线性关系。

4、溶解曲线峰型单一, 扩增特异性好。

- 2、向 293T 细胞 Total RNA ( 分别为 2 μg、200 ng、20 ng、2 ng、200 pg、20 pg、2 pg、0 pg ) 分别加入 200 ng 的人基因组 DNA, 使用本试剂盒进行基因组 DNA 去除反应。并以此 cDNA 为模板, 取 2 μl 的 cDNA 原液, 用 SYBR® Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit (Code. AG11701) 扩增 *GAPDH* 基因。



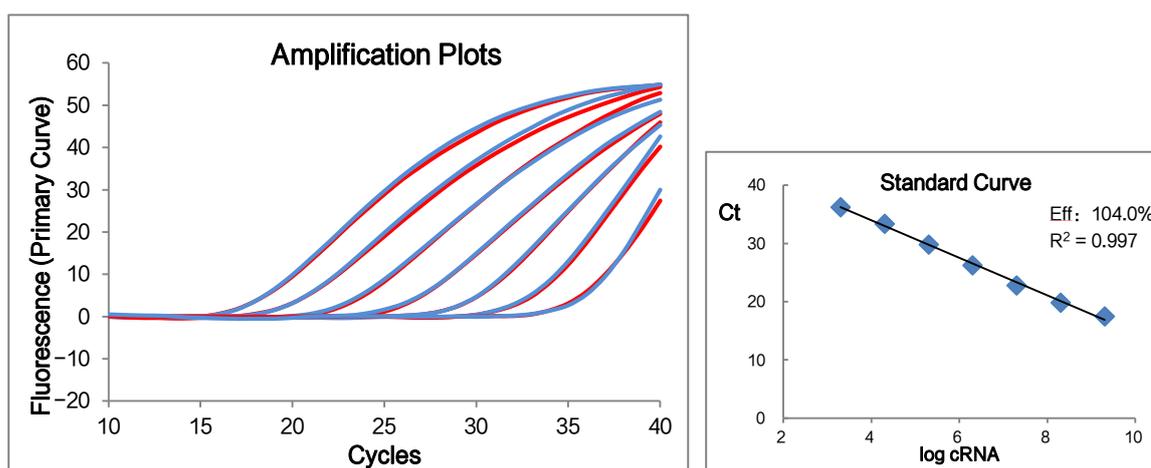
结果如上图所示：1、工作曲线  $R^2=0.995$ ，扩增效率 103.0%。

2、不加 RNA 但添加 gDNA 样品中，Ct 值在 35 cycles 以内没有检出。

3、本制品的反转效率高，能在宽广的模板范围内进行准确的定量， $2\ \mu\text{g} \sim 2\ \text{pg}$  Total RNA 反转录获得的 cDNA 扩增曲线呈现良好的线性关系。

4、溶解曲线峰型单一，扩增特异性好。

3、使用小鼠肝脏 Total RNA 为模板,使用本试剂盒进行基因组 DNA 去除反应以及反转录实验, RNA 起始模板量为  $2\ \mu\text{g} \sim 2\ \text{pg}$ 。取  $2\ \mu\text{l}$  的 cDNA 原液,用 *Pro Taq* HS Premix Probe qPCR Kit ( Code. AG11704 ) 采用探针法 qPCR 扩增小鼠 *GAPDH* 基因。



结果如上图所示：1、工作曲线  $R^2=0.997$ ，扩增效率为 104.0%；

2、本制品的反转效率高，能在宽广的模板范围内进行准确的定量， $2\ \mu\text{g} \sim 2\ \text{pg}$  Total RNA 反转录获得的 cDNA 扩增曲线呈现良好的线性关系。

## ➤ 产品注意事项

### 1. 保证模板的完整性及纯度

- ❖ RNA 的完整性：如果模板中含有 RNase，降解 RNA，将会影响 cDNA 的产量及长度。建议在提取 RNA 过程中，严防 RNase 污染，采取特殊的保护措施，如操作者佩戴手套和口罩，全程使用无 RNA 酶污染的实验耗材等。
- ❖ RNA 的纯度：RNA 纯化过程中混入的盐、金属离子、乙醇、苯酚、多糖多酚和腐殖酸等会抑制逆转录酶的活性。

### 2. gDNA 的去除

- ❖ 在进行下游定量 PCR 实验中，Total RNA 中混入的 gDNA 可直接作为 PCR 反应的模板进行扩增，造成实验结果的假阳性。因此在反转录之前需去除 RNA 模板中的 gDNA，保证用于定量 PCR 的模板中仅有 cDNA。可通过本试剂盒的 gDNA Clean Reagent 去除 gDNA。

### 3. 选用合适的引物

- ❖ Oligo(dT)引物：适用于含有 Poly(A)且完整性较好的 RNA。不适用于缺少 Poly(A)尾结构的 RNA，如原核生物 RNA；也不适用于已降解的 RNA，如 FFPE 样品中 RNA；对于含有复杂二级结构的 RNA，可能也不适用 Oligo(dT)引物。
- ❖ 随机引物：适用于 rRNA, tRNA, 非编码 RNA, microRNA, 降解 RNA, 复杂二级结构的 RNA 等。因为随机引物是由随机碱基组成的寡核苷酸，所以该类引物不具备特异性；随机引物可提高 cDNA 的产量和浓度，但是会使合成的 cDNA 长度变短。
- ❖ 基因特异性引物：适用于已知目的序列。基因特异性引物能够与模板特异性互补，产生目标性很强的 cDNA，对于后续的 PCR 扩增更具特异性。