

Version 4

Cat No. AG11706

Evo M-MLV 反转录试剂 预混液(用于 qPCR)

Evo M-MLV RT Premix 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

本制品是 Real Time RT-PCR 专用的反转录试剂预混液。使用了延伸能力较强的 *Evo M-MLV* 反转录酶，只需要 15 min 即可有效合成 cDNA，合成得到的 cDNA 可用于嵌合法和探针法 qPCR 分析。5X *Evo M-MLV* RT Master Mix 含有反转录反应所需的所有组分，只需加入 RNA 模板与水即可直接进行反应，使用方便，可减少试剂损失及实验误差。

本制品针对 Oligo dT (18T) Primer、Random 6 mers Primer 用量进行了优化，使反转录产物兼容嵌合法和探针法 qPCR 分析，能够进行高效的基因表达分析。

➤ 产品组成

组分名称	AG11706 (200 rxns / 10 μ l)
5X <i>Evo M-MLV</i> RT Master Mix ^{*1}	400 μ l
RNase free water	1 ml x 2 pc

*1: 含有 *Evo M-MLV* RTase、RNase Inhibitor、dNTP、Oligo dT (18T) Primer、Random 6 mers Primer、反应 Buffer

➤ 保存

保存温度：-20℃

运输温度：干冰或者-20℃冰袋

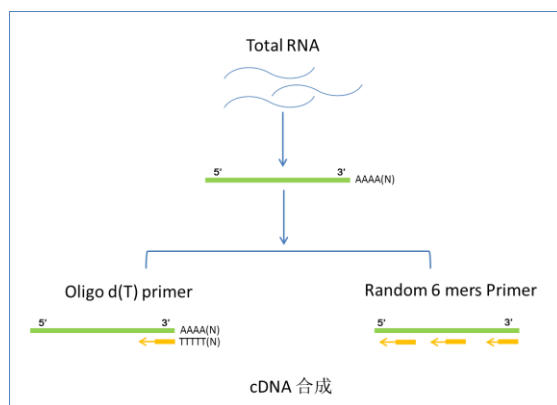
➤ 产品优势

1. 可快速高效合成 cDNA，仅需 15min 就可合成 cDNA，可用于嵌合法和探针法 qPCR 分析。
2. 本制品为预混 Premix，只需加入 RNA 模板与水即可直接进行反应。
3. 本制品针对 Oligo dT (18T) Primer、Random 6 mers Primer 用量进行了优化，使反转录产物兼容嵌合法和探针法 qPCR 分析。

➤ 实验原理

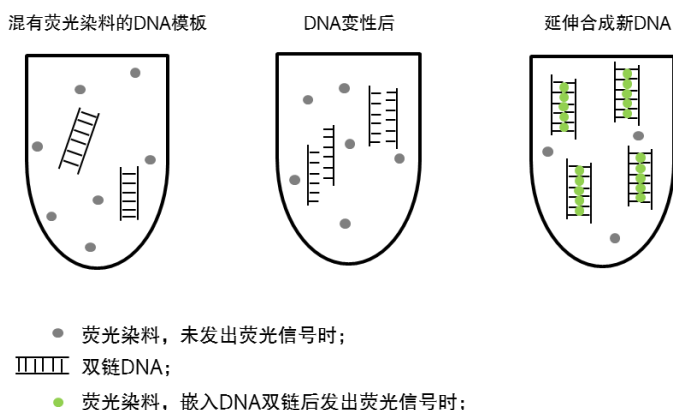
1. 反转录的原理

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 Poly A 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。如下图所示：



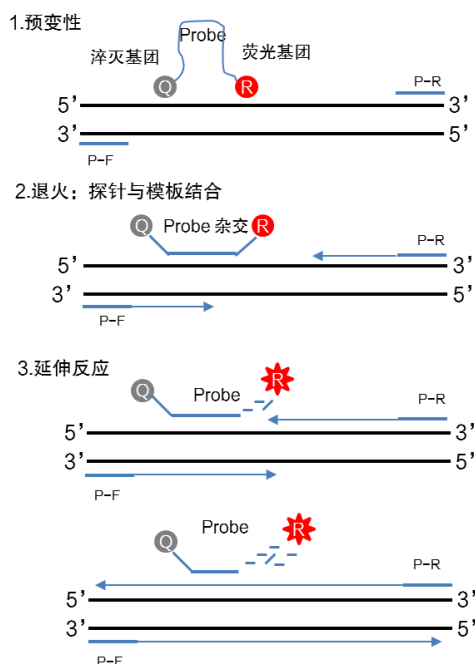
2. qPCR 反应原理

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

- 5X *Evo M-MLV* RT Master Mix 使用前先离心，将溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液枪轻轻吸打混匀，过程中尽量避免起泡，然后再进行使用。
- 由于本制品粘性较高，混匀时请用移液枪缓慢吹打，避免产生气泡。
- 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。
- 本试剂盒不含有去除基因组的成分，如有需要，可使用 DNase I (RNase Free) (Code. AG12001) 进行操作。
- 本制品是由 RNA 制备 cDNA 的反转录试剂盒，进行反转录反应时需要防止 RNase 的污染。需要使用灭菌的器具，操作过程中要避免讲话，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 水浴和 85°C 加热块)
2. RNase free 1.5 ml 离心管、0.2 ml PCR 管
3. 冰浴或冰盒
4. 移液器、枪头 (RNase free)

➤ 操作方法

1) 配制反转录反应液² (反应液配制在冰上进行)

组分名称	加入量
5X <i>Evo M-MLV</i> RT Master Mix	2 μ l
Total RNA ^{*1}	-
RNase free water	up to 10 μ l
反应条件: 37 °C 15 min	
85 °C	5 sec
4 °C	-

*1: RNA 量可根据需要添加。在 10 μ l 反转录体系中, 使用 SYBR Green qPCR 法时, 建议最多使用 500 ng Total RNA; 使用探针法时, 建议最多使用 1 μ g Total RNA。

*2: RT 反应液配制过程中要注意轻柔混匀。

2) 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 μ l 体系	50 μ l 体系
2X SYBR® Green <i>Pro Taq</i> HS Premix	10 μ l	25 μ l
cDNA ^{*1}	2 μ l	5 μ l
Primer F (10 μ M) ^{*2}	0.4 μ l	1 μ l
Primer R (10 μ M) ^{*2}	0.4 μ l	1 μ l
ROX Reference Dye (4 μ M) ^{*3,4}	0.4 μ l	1 μ l
RNase free water	Up to 20 μ l	Up to 50 μ l

*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 μ M, 当反应结果差时可以在 0.1 - 1.0 μ M 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 PCR 反应程序^{*1}:

	温度	时间	cycles
Step 1	95°C	30 sec ^{*2}	1
Step 2	95°C	5 sec	40
	60°C	30 sec ^{*3}	
Step 3	Dissociation stage		

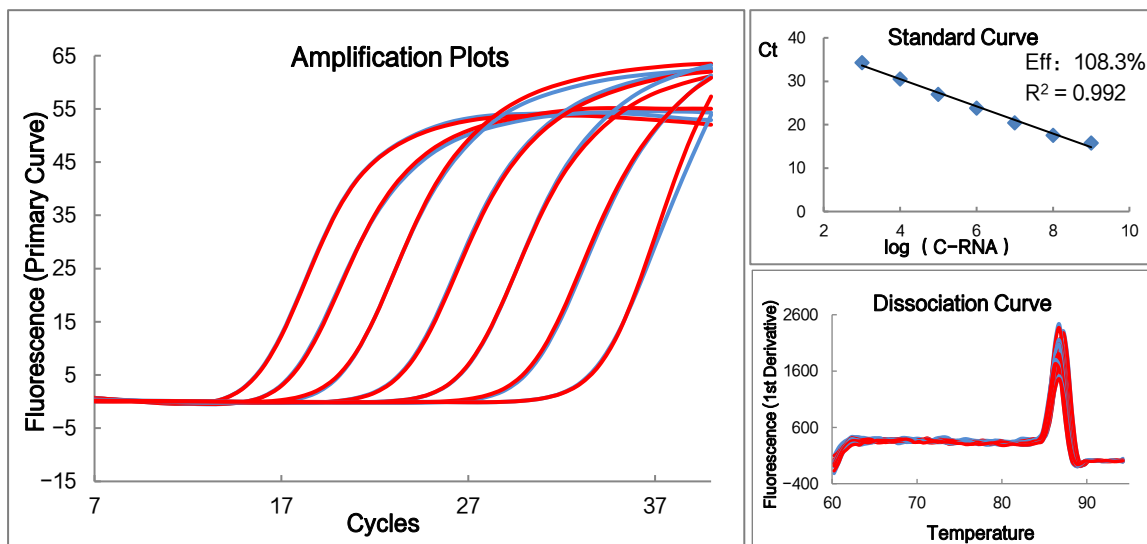
*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件; 如果引物 T_m 值较低, 导致两步法扩增效率较差, 可采用三步法进行 PCR 扩增。

*2: 预变性时间通常设定为 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、30 sec 时可以满足要求; 如需提高反应特异性, 可适当提高退火温度; 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

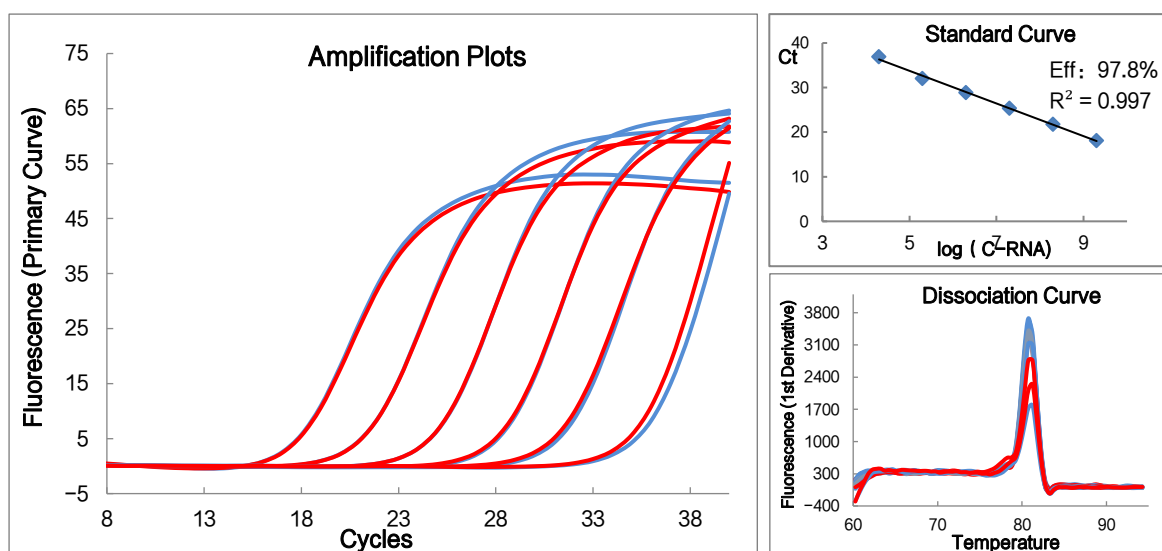
1. 使用本制品对小鼠 Total RNA 进行反转录，再以此 cDNA 为模板，取 2 μ l 的 cDNA 原液，通过嵌合法 qPCR 检测小鼠 *GAPDH* 基因（本实验例 qPCR 使用 SYBR Green® Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit, Code. AG11701 进行）。RNA 起始量 1 μ g~1 pg。



结果如上图所示：1、扩增效率为 108.3%， $R^2=0.992$ ；

- 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，1 μ g ~ 1 pg Total RNA 反转录获得的 cDNA 扩增曲线呈现良好的线性关系；
- 3、溶解曲线峰型单一，扩增特异性好。

2. 使用本制品对 293T 细胞的 Total RNA 进行反转录，RNA 起始量 1 μ g~10 pg。再以此 cDNA 为模板，取 2 μ l 的 cDNA 原液，通过嵌合法 qPCR 检测 Human *H32F* 基因 (*TFRC*)（本实验例 qPCR 使用 SYBR® Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit, Code. AG11701 进行）。

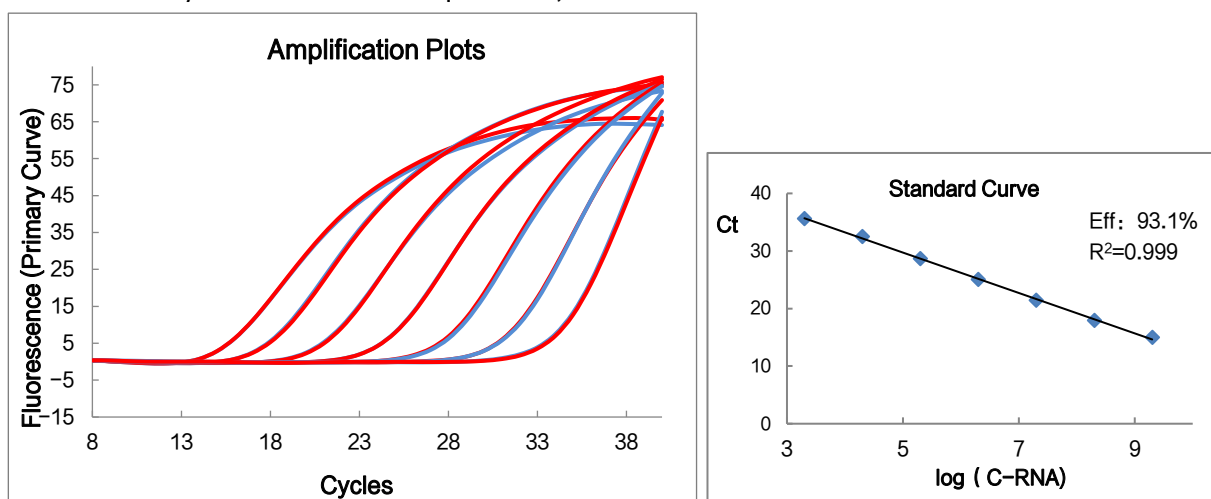


结果如上图所示：1、扩增效率为 97.8%， $R^2=0.997$ ；

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， $1\mu\text{g} \sim 10\text{pg}$ Total RNA 反转录获得的 cDNA 扩增曲线呈现良好的线性关系；

3、熔解曲线峰型单一，扩增特异性好。

3. 使用本制品对 293T 细胞的 Total RNA 进行反转录，RNA 起始量 $1\mu\text{g} \sim 1\text{pg}$ 。再以此 cDNA 为模板，取 $2\mu\text{l}$ 的 cDNA 原液，利用探针法 qPCR 检测 Human $\beta\text{-actin}$ 基因（qPCR 使用 Pro Taq HS Premix Probe qPCR Kit, Code No. AG11704 进行）。



结果如上图所示：1、扩增效率为 93.1%， $R^2=0.999$ ；

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， $1\mu\text{g} \sim 1\text{pg}$ 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. 实验细节

- ❖ 实验过程中应佩戴一次性的口罩、手套。
- ❖ 实验所用耗材，如枪头、定量 PCR 管等都建议使用 RNase-free 级别的耗材。

- ❖ RNA 的添加建议在专门的区域，避免混用后交叉污染。
- ❖ 本产品本制品粘性较高，使用前要确保混匀，请用移液枪缓慢吹打混匀（避免产生气泡）后使用。
- ❖ 检查反应程序，确保反应程序设置正确。