

Version 6

Code No. AG11728

# *Evo M-MLV* 反转录预混型试剂盒 ( 含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR ) Ver.2

## *Evo M-MLV* RT Mix Kit with gDNA Clean for qPCR Ver.2

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* 反转录酶的反转录试剂盒，cDNA 产物可直接用于 qPCR 检测。  
5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 中包含反转录反应所需的所有组分，并针对 Oligo dT (18T) Primer、Random 6 mers Primer 用量进行了优化，使反转录产物兼容染料嵌合法和探针法 qPCR 检测，能够进行高效的基因表达分析。

在进行下游定量 PCR 实验中，Total RNA 中混入的基因组 DNA (gDNA) 可直接作为反应的模板进行扩增，可能会造成实验结果的假阳性。本产品中 gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 可有效去除残留的基因组 DNA，确保定量结果的准确性；同时，本产品中配有 NRT Control Reaction Mix，可用于配制无反转录酶的阴性对照反应。

*Evo M-MLV* 反转录预混型试剂盒（含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR）Ver.2 是在原有 *Evo M-MLV* 反转录预混型试剂盒（含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR）的基础上进行优化升级，适用于不同的操作方法，客户可以根据需求进行选择：

- 1) **方法一：两步法（先去除 gDNA，再进行反转录）**：若提取的 RNA 中 gDNA 残留过多或对 gDNA 去除效果要求更高，建议使用此方法。
- 2) **方法二：All in one（去除 gDNA 与反转录反应在一管中同时进行）**：当 RNA 质量较高（gDNA 残留少），或反应中 RNA 浓度较高、目标基因拷贝数高时，可选用此方法，操作简便、快捷，可简化实验操作步骤，缩短实验时长。

## ➤ 产品组成

组分名称	AG11728 ( 100 rxns / 20 $\mu$ l )
gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 <sup>*1</sup>	240 $\mu$ l
5X <i>Evo M-MLV</i> RT Reaction Mix Ver.2 <sup>*2</sup>	400 $\mu$ l
NRT Control Reaction Mix <sup>*3</sup>	80 $\mu$ l
RNase free water	1 ml x 2 pcs

\*1: gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 可搭配 5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 或 NRT Control Reaction Mix 使用，若未搭配 NRT Control Reaction Mix 使用，gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 会有剩余。

\*2: 该溶液含有 *Evo M-MLV* RTase、RNase Inhibitor、dNTPs、Oligo dT (18T) Primer 与 Random 6 mers Primer。

\*3: 该溶液不含 *Evo M-MLV* RTase，其余组分与 5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 完全相同。

## ➤ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或者-20℃冰袋运输

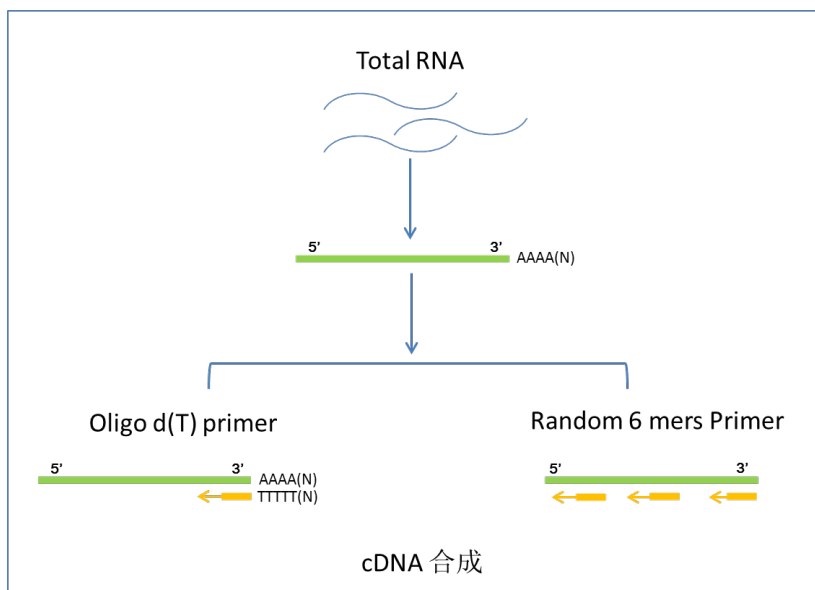
## ➤ 产品优势

1. 本产品中含有 gDNA 去除试剂 gDNA Clean Reaction Mix Ver.2，能够快速去除 RNA 模板中混有的 gDNA。
2. 本产品中将去除基因组及反转录所需试剂分别配制成预混液，使用方便，可减少试剂损失及实验误差。
3. 本产品适用于不同的操作方法，客户可以根据需求进行选择：既可选择两步法，先去除 gDNA，再进行反转录；也可选择 All in one，在一管中同时完成去除基因组与反转录反应，操作方便快捷。
4. 经本产品反转得到的 cDNA 同时适用于 SYBR 法和探针法 qPCR 分析。

## ➤ 实验原理

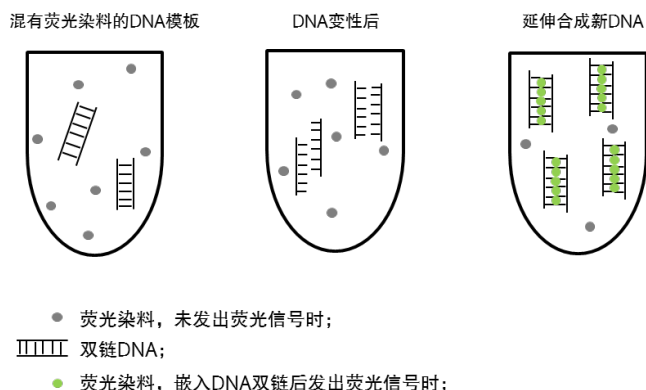
### 1. 反转录的原理

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 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. SYBR 荧光染料 qPCR 反应原理

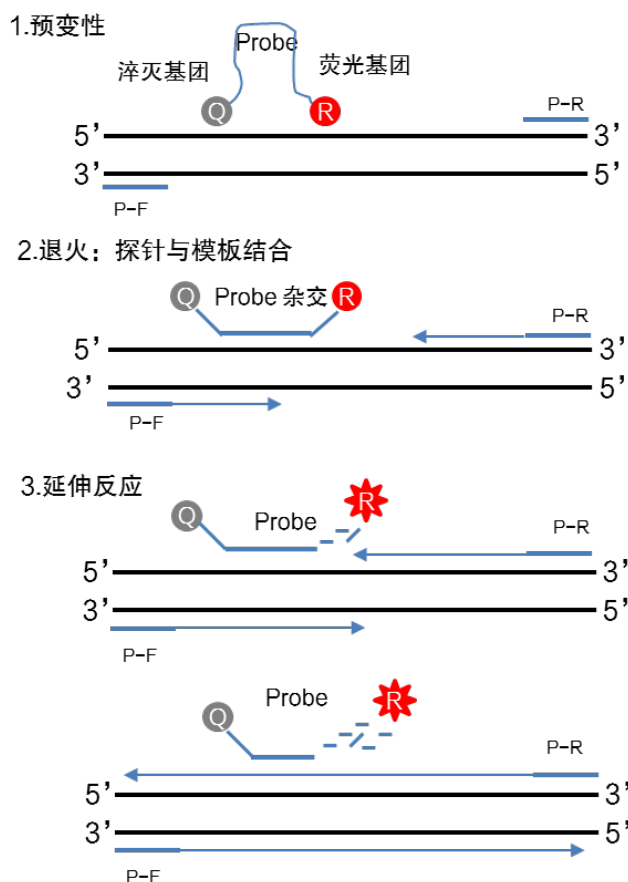
SYBR Green I 荧光染料嵌合法利用 SYBR Green I 与双链 DNA 结合后发出荧光的原理，首先将荧光染料 SYBR 加入定量 PCR 反应液中，在定量 PCR 扩增的延伸过程中，SYBR Green I 可以嵌合到双链 DNA 双螺旋小沟区域并发出荧光，此时通过检测反应进程中的荧光信号值，达到对靶标基因进行定性/定量分析的目的。



## 3. 荧光探针 qPCR 检测原理

探针法是通过检测反应液的荧光信号值，从而检测定量 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' 端标记有淬灭基团(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。

在定量 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，可对目的基因进行定量分析。



## ➤ 使用前注意事项

1. 请保持实验区域洁净，实验所用的离心管、枪头等耗材均需 RNase-free 级别，以避免 RNase 污染。操作过程中避免说话，且需穿戴好实验服、一次性手套等防止 RNA 被污染或降解。
2. gDNA Clean Reaction Mix Ver.2、5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 和 NRT Control Reaction 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。
3. 需要几个样本同时进行检测时，可先将各组分溶液配制成预混液，然后分装到每个反应管中。
4. 所有反应混合液建议在冰上配制。
5. 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，可使用本公司其他相关产品。
6. 由于反转录得到的 cDNA 产物中可能含有残留的 RNA 模板、未耗尽的反转录引物、残存的 dNTPs 及反应 buffer 中盐离子等均会影响浓度测定，从而导致测定的 cDNA 浓度不准确，因此反转录得到的 cDNA 不建议使用 Nanodrop 等设备测定浓度。

## ➤ 实验前准备

1. PCR 仪（或 37°C、42°C 和 85°C 的水浴或加热块）
2. 1.5 ml 离心管（RNase free）、PCR 管（RNase free）
3. 冰盒
4. 移液器、枪头（RNase free）

## ➤ 操作步骤

### 1. 去基因组 DNA 与反转录反应

本产品是对 RNA 进行反转录合成 cDNA 的试剂盒，同时可去除 RNA 中的 gDNA。本产品有两种使用方法，可根据需求进行选择。操作如下：

## 方法一：两步法（先去除 gDNA，再进行反转录）：

### 1) 去除 gDNA

按照下表在冰上配制反应液<sup>\*1、\*2</sup>，进行基因组 DNA 去除反应。

组分名称	体系 1 <sup>*3</sup>	体系 2 <sup>*3</sup>
gDNA Clean Reaction Mix Ver.2	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Total RNA <sup>*4</sup>	—	—
RNase free water	up to 10 $\mu$ l	up to 16 $\mu$ l

反应条件：42 °C 2 min

4 °C<sup>\*5</sup> Hold<sup>\*5</sup>

\*1：反应体系可以根据需要进行调整，各组分按比例变更即可。

\*2：配制试剂时，建议先将 gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 与 RNase free water 配制预混液，用移液器轻柔吸打混匀后，再加入 RNA 模板。

\*3：体系 1（10  $\mu$ l 体系）与体系 2（16  $\mu$ l 体系）可按需求进行选择。若 RNA 浓度较低，可选择体系 2，增加 RNA 的加入量，将反应体积增大，补加 RNase free water 至 16  $\mu$ l 进行反应，同时，省略下述**步骤 2**）反转录反应中 RNase free water 的添加。若 RNA 浓度较高，体系 1 与体系 2 均可选择。

\*4：Total RNA 可根据需要添加，提取的 RNA 建议使用 RNase free water 进行溶解。在 20  $\mu$ l 反转录体系中，使用 SYBR 法进行 qPCR 扩增时，建议 Total RNA 加入量不超过 1  $\mu$ g；使用探针法进行 qPCR 扩增时，建议 Total RNA 加入量不超过 2  $\mu$ g。

\*5：反应产物取出后置于冰上，待**步骤 2**）预混液配制完成后立即加入至上述反应产物中，进行后续反转录反应。

### 2) 反转录反应

按照下表在冰上配制反转录反应液<sup>\*1</sup>，置于 PCR 仪进行反转录反应。

组分名称	体系 1 <sup>*2</sup>	体系 2 <sup>*2</sup>
<b>步骤 1）反应液</b>	10 $\mu$ l	16 $\mu$ l
5X <i>Evo M-MLV</i> RT Reaction Mix Ver.2 <sup>*3</sup>	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
RNase free water	6 $\mu$ l	—
Total	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

反应条件：37 °C 15 min

85 °C 5 sec

4 °C<sup>\*4</sup> Hold<sup>\*4</sup>

\*1：反应体系可以根据需要进行调整，各组分按比例变更即可。

\*2：若按体系 1 配制反转录反应液时，可将 5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 和 RNase

free water 预先配制成预混液，再分装 10  $\mu$ l 到上述步骤 1) 的 10  $\mu$ l 反应液中，用移液器轻柔吸打混匀后进行反转录反应；若按体系 2 配制反转录反应液时，直接添加 4  $\mu$ l 的 5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 至上述步骤 1) 的 16  $\mu$ l 反应液中，用移液器轻柔吸打混匀后进行反转录反应。

\*3: NRT Control 是指无反转录酶的阴性对照反应，可根据实际需要进行配制。配制时，将 5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 替换成 NRT Control Reaction Mix 即可。

\*4: 若反应产物立即用于后续 qPCR 反应，可暂放于 4°C 或冰上；如短期保存建议放置于 -20°C；如需长期保存建议放置于 -80°C。

## 方法二：All in one (去除 gDNA 与反转录反应同时进行)：

当 RNA 质量较高 (gDNA 残留少)，或反应中 RNA 浓度较高、目标基因拷贝数较高时，可将去除 gDNA 与反转录合为一步操作。

按照下表配制反应液<sup>\*1、\*2</sup>，同时进行基因组 DNA 去除与反转录反应。

组分名称	加入量
gDNA Clean Reaction Mix Ver.2	2 $\mu$ l
5X <i>Evo M-MLV</i> RT Reaction Mix Ver.2 <sup>*3</sup>	4 $\mu$ l
Total RNA <sup>*4</sup>	-
RNase free water	up to 20 $\mu$ l
反应条件：37 °C      15 min	
85 °C      5 sec	
4 °C <sup>*5</sup> Hold <sup>*5</sup>	

\*1: 反应体系可以根据需要进行调整，各组分按比例变更即可。

\*2: 配制试剂时，建议加样顺序按照 RNase free water、gDNA Clean Reaction Mix Ver.2、5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 依次添加，配制完成后用移液器轻柔吸打混匀，混匀后加入 RNA 模板。

\*3: NRT Control 是指无反转录酶的阴性对照反应，可根据实际需要进行配制。配制时，将 5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 替换成 NRT Control Reaction Mix 即可。

\*4: Total RNA 可以根据需要添加，提取的 RNA 建议使用 RNase free water 进行溶解。在 20  $\mu$ l 反转录体系中，使用 SYBR 法进行 qPCR 扩增时，建议 Total RNA 加入量不超过 1  $\mu$ g；使用探针法进行 qPCR 扩增时，建议 Total RNA 加入量不超过 2  $\mu$ g。

\*5: 反应产物如立即用于后续 qPCR 反应，可暂放于 4°C 或冰上；如短期保存建议放置于 -20°C；如长期保存建议放置于 -80°C。

## 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。以公司产品 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (Code No. AG11701) 为例，具体操作如下：



(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems 为例)

组分名称	反应终浓度	20 $\mu$ l 体系
2X SYBR Green <i>Pro Taq</i> HS Premix	1X	10 $\mu$ l
cDNA <sup>*1</sup>	–	2 $\mu$ l
Primer F (10 $\mu$ M) <sup>*2</sup>	0.2 $\mu$ M <sup>*2</sup>	0.4 $\mu$ l
Primer R (10 $\mu$ M) <sup>*2</sup>	0.2 $\mu$ M <sup>*2</sup>	0.4 $\mu$ l
RNase free water		up to 20 $\mu$ 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%。若用 cDNA 原液进行定量 PCR 反应, 出现荧光信号偏低的情况时, 可尝试将 cDNA 原液稀释 2~10 倍后进行实验。

\*2: 引物通常使用终浓度为 0.2  $\mu$ M, 当反应结果不好时可以在 0.1~1.0  $\mu$ M 范围内调整。

#### 两步法 qPCR 扩增程序<sup>\*1, \*2</sup>

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec <sup>*3</sup>	1
变性	95°C	5 sec	40
退火和延伸 <sup>*5</sup>	60°C <sup>*4</sup>	30 sec <sup>*4</sup>	
熔解曲线采集 <sup>*6</sup>	95°C	15 sec	1
	60°C	1 min	
	95°C	1 sec	

\*1: 建议首先采用上表中推荐的两步法 qPCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件。

\*2: 如果引物 T<sub>m</sub> 值较低, 导致两步法扩增效率较差, 可采用三步法进行 qPCR 扩增。

\*3: 预变性时间通常设定为 30 sec, 如果模板变性困难, 可根据实际需求延长预变性时间至 30 sec ~ 2 min。

\*4: 通常情况下 qPCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增退火和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, 可适当提高退火和延伸温度; 如需提高扩增效率, 或 qPCR 扩增产物较长, 则可将反应退火和延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 qPCR 扩增。

\*5: 此步骤进行荧光信号值采集。

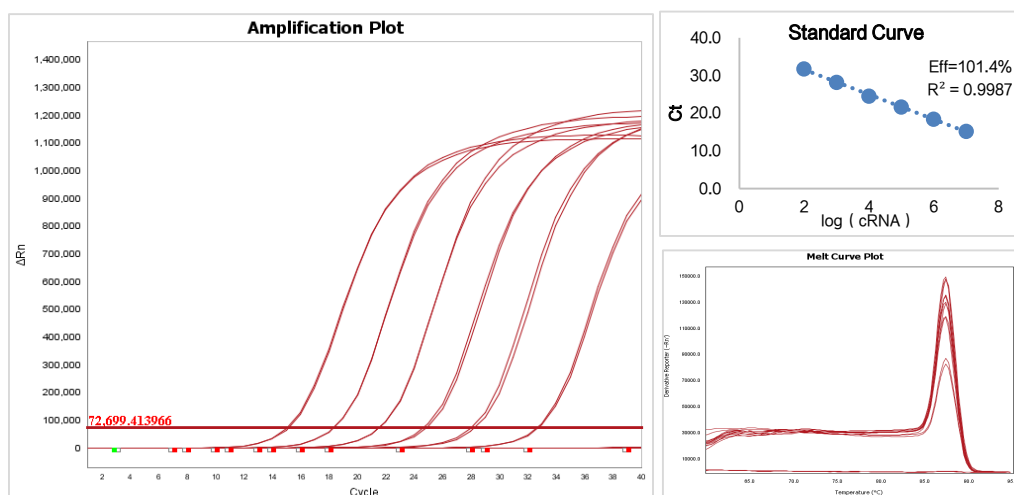
\*6: 此步为必须步骤, 此熔解曲线为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems Standard 模式下默认程序。但仪器类型不同, 熔解曲线采集程序不尽相同, 使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。



## ➤ 实验例

- 1、向 293T Cell Total RNA ( 分别为 200 ng、20 ng、2 ng、200 pg、20 pg、2 pg、0 pg ) 中分别加入 200 ng 的 Human 基因组 DNA，使用本产品去除基因组 DNA，然后进行反转录实验 ( **方法一：两步法的体系 1** )，并以此 cDNA 为模板，取 2  $\mu$ l 的 cDNA 原液，使用本公司产品 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒(Code No. AG11701)进行 qPCR 扩增检测 Human 的 *Actin* 基因。

所用定量仪器：ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。结果如下：



结果如上图所示：1、工作曲线  $R^2=0.9987$ ，扩增效率是 101.4%。

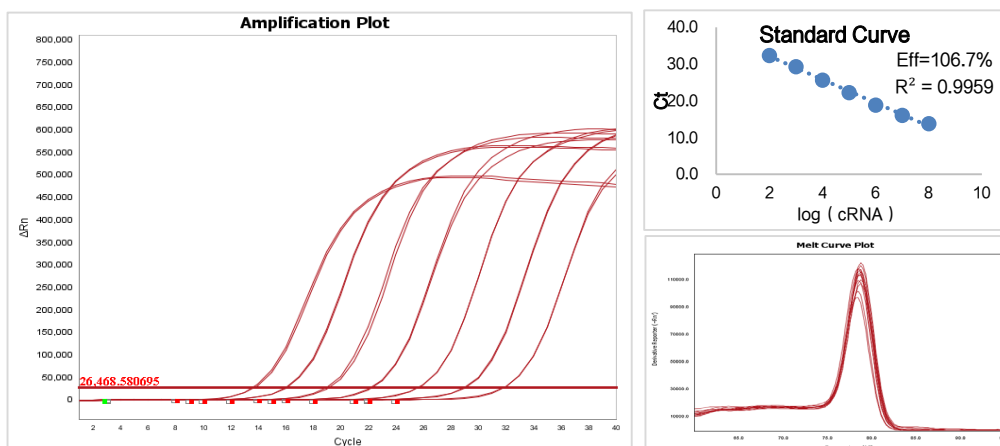
2、不添加 RNA 但添加 gDNA 样品中，Ct 值在 35 cycles 以内没有检出。

3、本产品的反转效率高，能在宽广的模板范围内进行准确的定量，200ng ~ 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、熔解曲线峰型单一，扩增特异性好。

- 2、使用本产品对 Mouse Liver Total RNA 进行反转录 ( **方法二：All in one** )，Total RNA 起始量为 1  $\mu$ g、100ng、10ng、1ng、100pg、10pg、1 pg。以反转录产物 cDNA 为模板，取 2  $\mu$ l 的 cDNA 原液，使用本公司产品 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 (Code No. AG11701)进行 qPCR 扩增，检测 Mouse 的 *GAPDH* 基因。

所用定量仪器：ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。结果如下：



结果如上图所示：1、工作曲线  $R^2=0.9959$ ，扩增效率是 106.7%。

2、本产品的反转效率高，能在宽广的模板范围内进行准确的定量， $1\mu g \sim 1\text{ pg}$  Total RNA 反转录获得的 cDNA 扩增曲线呈现良好的线性关系。

3、熔解曲线峰型单一，扩增特异性好。

## ➤ 产品注意事项

### 1. 保证模板的完整性及纯度

- ❖ RNA 的完整性：若模板中含有 RNase，RNase 会降解 RNA，从而影响 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，如操作者穿戴好实验服，佩戴一次性手套和口罩，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反转录酶的活性。可在无核酸酶水中稀释起始 RNA，以降低潜在的抑制剂浓度；或重新纯化 RNA 样品，以除去残留的盐和抑制剂。

### 2. gDNA 的去除

- ❖ 在进行下游定量 PCR 实验中，Total RNA 中混入的 gDNA 可直接作为反应的模板进行扩增，造成实验结果的假阳性。gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 能够在反转录之前去除 RNA 模板中的 gDNA，保证定量结果的准确性。
- ❖ 如果 RNA 模板中 gDNA 残留太多，使用本产品的两步法也不能获得良好的实验结果，建议重新提取模板，并且在提取 RNA 的过程中使用 DNase I 进行消化，确保获得质量更好的 RNA 模板，再搭配本产品进行实验。

### 3. 反转录方法选择

- ❖ 若提取的 RNA 中 gDNA 含量很高，或者对 gDNA 消除效果要求很高，建议按照**方法一：两步法**的操作进行实验。

- ❖ 当 RNA 质量较高（gDNA 残留少），或反应中 RNA 浓度较高、目标基因拷贝数高时，建议选择**方法二：All in one** 的操作更加便捷，省时省力。

#### 4. 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。