

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-MLVRT Mix Kit with gDNA Clean for qPCR Ver.2

Code No. AG11728

包装量: 100 rxns / 20 μ l
保存温度: -20°C

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-MLVRT* 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

gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 ¹	240 μ l
5X <i>Evo M-MLVRT</i> Reaction Mix Ver.2 ²	400 μ l
NRT Control Reaction Mix ³	80 μ l
RNase free water	1 ml x 2 pcs

*1: gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 可搭配 5X *Evo M-MLVRT* 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-MLVRT*ase、RNase Inhibitor、dNTPs、Oligo dT (18T) Primer 与 Random 6 mers Primer。

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

保存及运输

保存温度: -20°C 保存

运输温度: 干冰运输或者 -20°C 冰袋运输

注意事项

1. gDNA Clean Reaction Mix Ver.2、5X *Evo M-MLVRT* 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。
2. 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。
3. 所有反应混合液建议在冰上配制。
4. 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。

实验操作

1. 去基因组 DNA 与反转录反应

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¹、², 进行 gDNA 去除反应。

组分名称	体系 1 ³	体系 2 ³
gDNA Clean Reaction Mix Ver.2	2 μ l	2 μ l
Total RNA ⁴	-	-
RNase free water	up to 10 μ l	up to 16 μ l

反应条件: 42 °C 2 min

4 °C⁵ Hold⁵

- *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 配制成预混液, 用移液器轻柔吸打混匀后, 再加入 RNA 模板。
- *3: 体系 1 (10 μl 体系) 与体系 2 (16 μl 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 μl 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 可以根据需要添加, 提取的 RNA 建议使用 RNase free water 进行溶解。在 20 μl 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 μg; 使用探针法进行 qPCR 扩增时, 建议 Total RNA 加入量不超过 2 μg。
- *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^{*1}, 置于 PCR 仪进行反转录反应。

组分名称	体系 1 ²	体系 2 ²
步骤 1) 反应液	10 μl	16 μl
5X <i>Evo M-MLV</i> RT Reaction Mix Ver.2 ³	4 μl	4 μl
RNase free water ^{*1}	6 μl	-
Total	20 μl	20 μl

反应条件: 37 °C 15 min
85 °C 5 sec
4 °C⁴ Hold⁴

- *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 μl 到上述**步骤 1**) 的 10 μl 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 μl 的 5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 至上述**步骤 1**) 的 16 μl 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、目标基因拷贝数高时, 可将去除 gDNA 与反转录合为一步操作。按照下表在冰上配制反应液^{*1、*2}, 同时进行 gDNA 去除与反转录反应。

组分名称	加入量
gDNA Clean Reaction Mix Ver.2	2 μl
5X <i>Evo M-MLV</i> RT Reaction Mix Ver.2 ³	4 μl
Total RNA ^{*4}	-
RNase free water	up to 20 μl ⁴

反应条件: 37 °C 15 min
85 °C 5 sec
4 °C⁵ Hold⁵

- *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 μl 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 μg; 使用探针法进行 qPCR 扩增时, 建议 Total RNA 加入量不超过 2 μg。
- *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

经上述反转录反应得到的 cDNA 可以直接进行定量 PCR 分析。推荐搭配本公司产品 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 (Code No. AG11701), 具体操作见详细说明书 (详细说明书可于官网 www.agbio.com.cn 下载)。