

Version 2

Code No. AG11623

Evo Super M-MLV Plus 1st cDNA

合成预混液

Evo Super M-MLV Plus 1st Strand cDNA
Synthesis Mix

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

本产品是从 total RNA 或 poly(A)⁺ RNA 起始合成 1st strand cDNA 的试剂盒。合成 1st strand cDNA 所需的反转录酶 *Evo Super M-MLV* plus、RNase Inhibitor、Oligo dT Primer、dNTP Mixture 及反应 Buffer 已预混成 Premix 型试剂，只需要添加 RNA 模板及水即可简单快速开始反应。

本产品通过添加辅助蛋白及优化 Buffer 组成，减少了反转录反应前的 RNA 变性操作，操作更加方便。

本产品具有合成效率高、反应速度快、灵敏度高、热稳定性高、抗抑制能力强等特点，能在 42°C ~ 60°C 条件下更高效合成 1st Strand cDNA；同时由于反转录反应可以在高温下进行，使用 Gene Specific Primer 合成 1st Strand cDNA 时提升了反转录效率及特异性。

本产品合成的 1st strand cDNA 适用于 2nd strand cDNA 合成、杂交、PCR 法扩增，全长 cDNA 文库的制备等。本产品中包含 Random 6 mers，可以从不含 poly(A)⁺ 的 RNA 合成 cDNA，同时也适用于 Real Time PCR 进行基因表达分析。

➤ 产品组成

组分名称	体积
4X <i>Evo Super M-MLV</i> Plus cDNA Synthesis Mix ^{*1}	250 μl
Random 6 mers Primer (100uM) ^{*2}	100 μl
RNase free water	1 ml x 2 pcs

*1: 含有 *Evo Super M-MLV*、RNase Inhibitor、Oligo dT (18T) Primer、dNTP Mixture 及反应 Buffer。

*2: 在不含 poly(A)⁺ 的 RNA 起始 cDNA 的合成、Real Time PCR 用的 cDNA 合成及 RNA 全部区域 cDNA 的均匀合成等情况下，此组分需添加至反应液中。

➤ 保存及运输

保存温度：-20°C 保存

运输温度：干冰运输或 -20°C 冰袋运输

➤ 产品优势

1. 操作方便：已配制成预混液，只需加入模板 RNA 及水即可反应，且试剂在-20℃不会冻结，试剂从-20℃冰箱取出即可进行反应配制。
2. 热稳定性强：可在 42℃ ~ 60℃ 条件下进行反转录反应，高温有利于具有复杂二级结构 RNA 模板的合成。
3. 杂质耐受性强：对 RNA 中残留的抑制剂（如异硫氰酸胍、乙醇、EDTA、肝素钠与血红素等干扰物质）具有良好的抗性。
4. 使用范围广：合成的 cDNA 可用于常规 PCR 及 qPCR，产品中附带了 Random 6 mers，可以从不含 poly(A)⁺ 的 RNA 合成 cDNA。
5. 转录能力强：可合成长达 12 kb 的 cDNA。
6. 转录速度快：最快 5 min 内可完成反转录反应。

➤ 使用注意事项

1. 4X *Evo Super M-MLV* Plus cDNA Synthesis 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，并用移液枪轻轻吸打混匀后再使用，过程中尽量避免起泡，使用完后建议尽快置于 -20℃ 保存。
2. 操作时需注意防止实验环境和操作过程中的 RNase 污染。
3. 反应体系需要在冰上配制，最后将配制好的反应液放置于 PCR 仪中反应。
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。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：
引物、水（RNase-free）、1.5 ml 离心管（RNase-free）、PCR 管（RNase-free）、枪头（RNase-free）。
2. 仪器：
PCR 仪、移液器、旋涡振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

➤ 操作方法

一、反转产物用于 PCR 扩增

第一链 cDNA 合成：

1. 按照下表内容配制反应液：

组分名称	加入量
4X <i>Evo Super M-MLV</i> Plus cDNA Synthesis Mix	5 μ l
Random 6 mers Primer (100 μ M) ^{*1, *2}	0 ~ 2 μ l
Template RNA	Total RNA: \leq 5 μ g poly(A) ⁺ RNA: \leq 1 μ g
RNase free water	Up to 20 μ l

*1: 如反转录的 RNA 含 poly(A)⁺ 时, 可不添加 Random 6 mers Primer。如需添加 Random 6 mers Primer 进行反转时, 合成 2 kb 以下的 cDNA 时, 建议添加 1 μ l 进行反转, 可根据实际情况在 1 ~ 2 μ l 范围内进行调整; 合成 2 kb 以上的 cDNA 时, 推荐 Random 6 mers Primer 的使用量为 0 ~ 1 μ l。

*2: 也可以使用 Gene Specific Primer, 此时, 其在反应体系中的终浓度为 0.1 μ M。

2. 合成 cDNA 反应条件：

30°C	5 min ^{*1}
55°C ^{*2}	15 min ^{*3}
85°C ^{*4}	5 min ^{*4}
4°C	—

*1: 如未使用 Random 6 mers Primer 进行反转录时, 可省略此步骤;

如使用 Random 6 mers Primer 进行反转录时, 建议在反应开始前进行 30°C, 5 min 处理, 可使 Random 引物与模板充分退火增加反转录效率, 也可根据实验需求在 0 ~ 10 min 范围内调整, 如使用 30°C, 5 min 结果不理想, 可将退火时间延长至 10 min。

*2: *Evo Super M-MLV* Plus 对于含有复杂二级结构的模板同样具有良好的延伸性能, 反转温度通常设置为 55°C 即可获得理想结果, 也可以根据实际情况将温度在 50°C ~ 60°C 范围内进行调整, 如反转的 cDNA 长度较长或者模板较复杂可提高反转温度至 55°C ~ 60°C。使用 Gene Specific Primer 时, 反转录温度可在 50°C ~ 60°C 范围内调整。

*3: 一般情况下反转时间 15 min 均能获得较好结果, 如果反转的长度 < 4kb, 反转时间可根据需求在 5 min ~ 15 min 内调整, 如反转 cDNA 长度较长或者模板较复杂, 反转录时间可以在 15 min ~ 30 min 内调整。

*4: 进行长片段 cDNA 扩增时, 为保证 1st cDNA 链完整, 可进行 70°C, 15 分钟的失活反应。

3. 上述得到的 cDNA 溶液可以直接用于后续 PCR 扩增, 反应液用量不要超过 PCR 体系的 1/10。

二、反转产物用于 Real Time PCR 定量检测

第一链 cDNA 合成：

1. 按照下表内容配制反应液：

组分名称	加入量
4X <i>Evo Super M-MLV</i> Plus cDNA Synthesis Mix	5 μ l
Random 6 mers Primer (100 μ M) ^{*1, *2}	2 μ l
Template RNA	Total RNA: $\leq 5 \mu$ g poly(A) ⁺ RNA: $\leq 1 \mu$ g
RNase free water	Up to 20 μ l

*1: 合成 cDNA 产物用于 Real Time PCR 进行基因表达分析时，建议添加 2 μ l Random 6 mers Primer 进行反转，如基因的丰度较低或者模板较复杂（如 GC 含量较高）或结果不理想时可将 Random 6 mers Primer 用量提升至 4 μ l。

*2: 也可以使用 Gene Specific Primer，此时，其在反应体系中的终浓度为 0.1 μ M。

2. 合成 cDNA 反应条件：

30°C	5 min ^{*1}
50°C ^{*2}	15 min ^{*3}
85°C	5 min ^{*4}
4°C	—

*1: 使用 Random 6 mers Primer 进行反转录时，建议在反应开始前进行 30°C，5 min 处理，可使 Random 引物与模板充分退火增加反转录效率，也可根据实验需求在 0 ~ 10 min 范围内调整，如使用 30°C，5 min 结果不理想，可将退火时间延长至 10 min。

*2: *Evo Super M-MLV* Plus 对于含有复杂二级结构的模板同样具有良好的延伸性能，反转温度通常设置为 50°C 即可获得理想结果，也可以根据实际情况将温度在 42°C ~ 55°C 范围内进行调整。使用 Gene Specific Primer 时，反转录温度可在 50°C ~ 60°C 范围内调整。

*3: 一般情况下反转时间 15 min 均能获得较好结果，反转时间可根据需求在 5 min ~ 15 min 内调整。

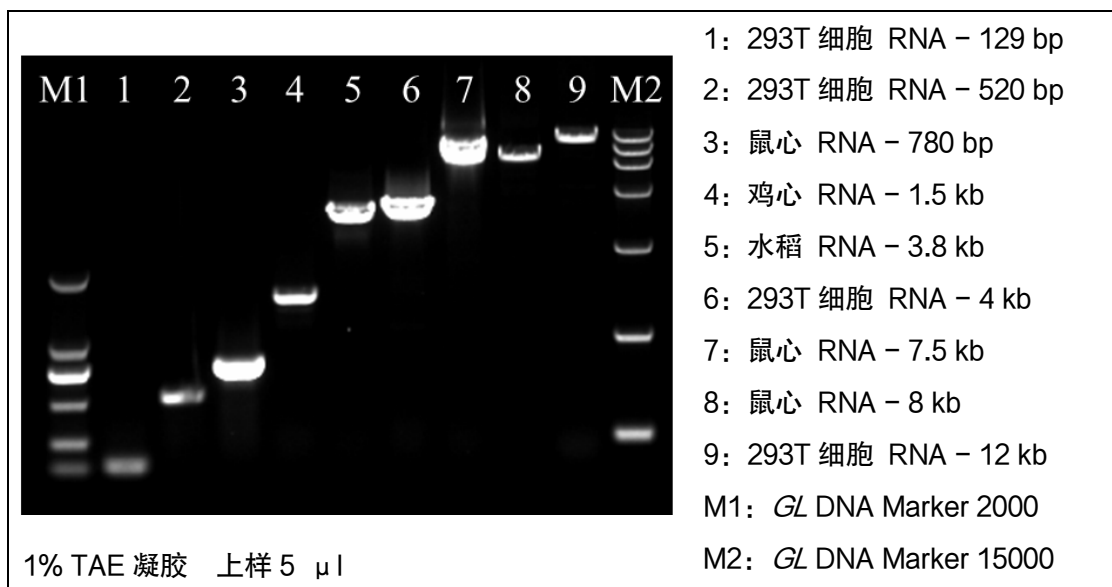
*4: 一般情况下 85°C，5min 可以让反转酶彻底失活，可根据需求在 2 min ~ 5 min 内调整。

3. 上述得到的 cDNA 溶液可以直接用于后续 qPCR 扩增，反应液用量不要超过 qPCR 体系的 1/10。

➤ 实验例

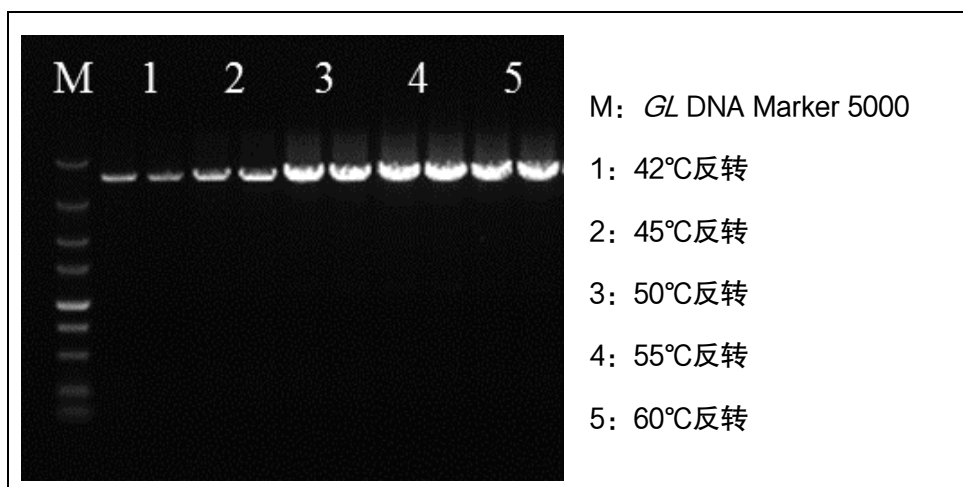
1. 以不同样本 RNA 为模板，使用本产品进行反转，反转温度为 55℃，反转后使用本公司 2X *L-Exp Taq* Master Mix (Code No. AG11417) 扩增不同长度的片段，均能得到较好的扩增效果。

电泳结果如下图所示：



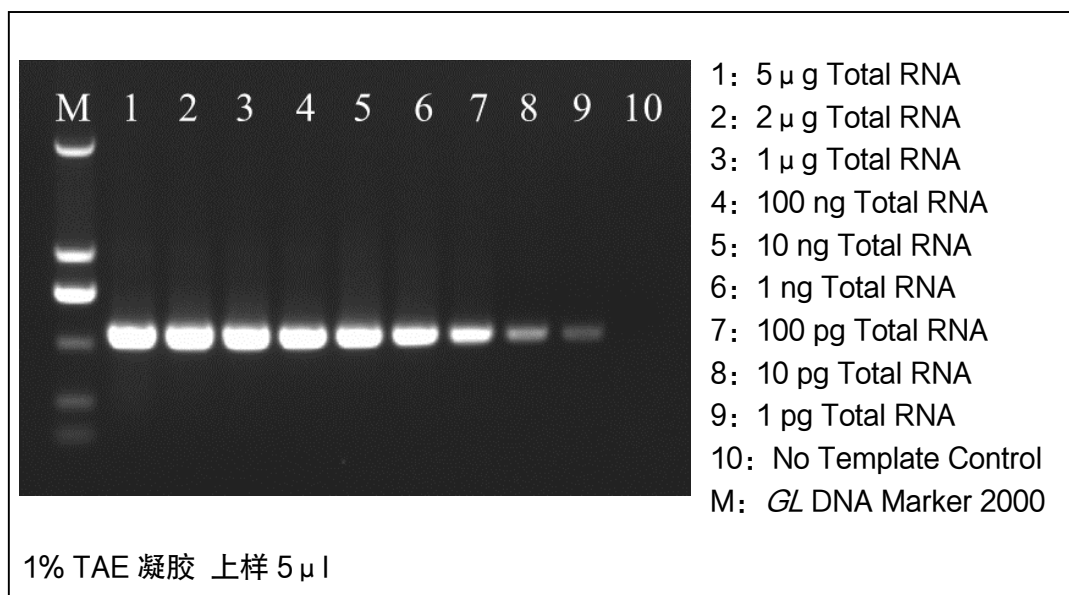
2. 以 Mouse Heart RNA 为模板（模板量为 1 μ g），使用本产品在不同温度下（42℃、45℃、50℃、55℃、60℃）进行反转，反转后使用本公司 2X *L-Exp Taq* Master Mix (Code No. AG11417) 扩增 4kb 片段，结果表明：本产品在 42℃ ~ 60℃ 温度范围内均能进行反转扩增，**推荐最适反转温度为 55℃**。

电泳结果如下图所示：

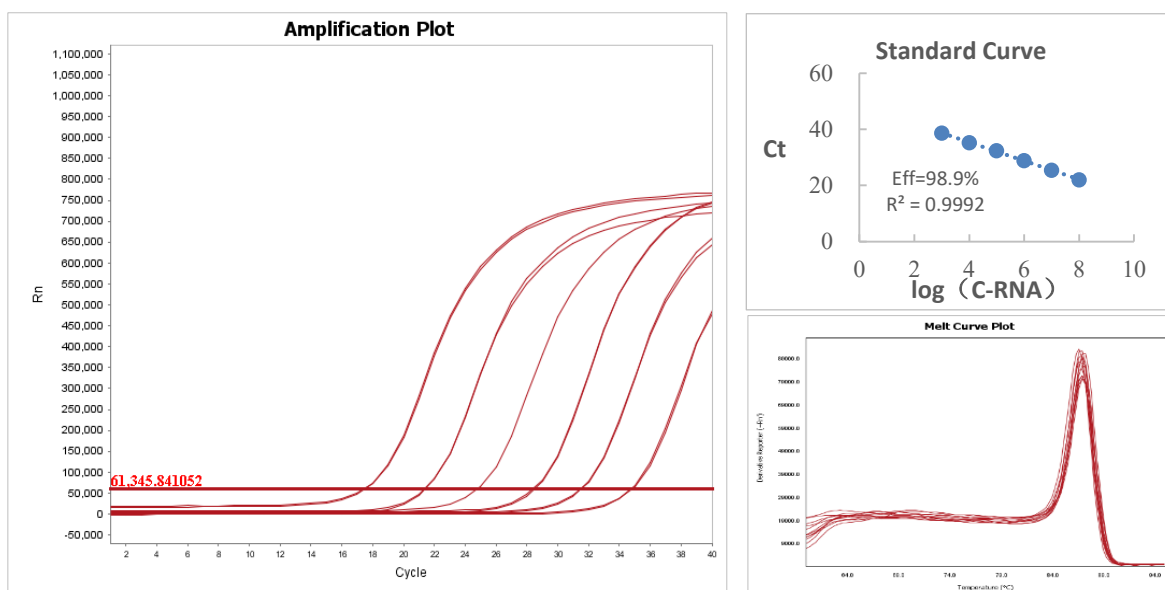


3. 以 293T 细胞 Total RNA 为模板,使用本产品进行一步法 RT-PCR 扩增 537 bp 片段。模板添加量为 5 μ g、2 μ g、1 μ g、100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg, 检测灵敏度可达到 1 pg。

电泳结果如下:



4. 以 293T Total RNA (100 ng ~ 1 pg) 为模板,使用本产品进行反转, 反转产物搭配本公司 SYBR Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit (Code No. AG11701) 进行定量检测, 扩增 Human *GAPDH* 基因。所用定量仪器为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。实验结果如下:



结果如下图所示：

- 1、不同浓度的模板在 45 cycles 以内均能获得良好的扩增。
- 2、扩增效率为 98.9%， $R^2=0.9992$ 。
- 3、熔解曲线峰型单一、无杂峰，扩增特异性强。

➤ 产品注意事项

1. 合适的模板

- ❖ 模板加入量降低时，扩增效率降低，扩增特异性升高；模板加入量升高时，扩增效率升高，扩增特异性降低；可根据实际情况调整模板加入量。
- ❖ 模板的纯度及完整性影响 PCR 反应，采用高质量高纯度的 RNA 模板，可提高反转录实验的成功率，降低外源污染。
- ❖ 模板降解或模板中含有抑制反转录反应的物质等，都可能会导致反转录反应扩增效率降低，反转录反应产物产量减少，建议更换模板，重新实验。

2. 实验细节

- ❖ 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。
- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡。
- ❖ 反应时需要使用已灭菌的器具，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。
- ❖ RNA 的添加建议在专门的区域，避免混用后交叉污染。
- ❖ 检查反应程序，确保反应程序设置正确。