

# Evo Super M-MLV Plus 1st cDNA 合成预混液

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

Code No. AG11623

**包装量:** 50 rxns  
**保存温度:** -20°C

### 产品概述

本产品是从 total RNA 或 poly(A)<sup>+</sup> 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，可以从不含有 poly(A)<sup>+</sup> 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 Plus</i> cDNA Synthesis Mix <sup>*1</sup>	250 μl
Random 6 mers Primer (100uM) <sup>*2</sup>	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)<sup>+</sup> 的 RNA 起始 cDNA 的合成、Real Time PCR 用的 cDNA 的合成及 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

### 实验前准备

- 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)。
- 仪器:** PCR 仪、移液器、漩涡振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

### 使用注意事项

- 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°C 保存。
- 操作时需注意防止实验环境和操作过程中的 RNase 污染。
- 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。
- 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。

### 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 Plus</i> cDNA Synthesis Mix	5 μl
Random 6 mers Primer (100 μM) <sup>*1, *2</sup>	0 ~ 2 μl
Template RNA	Total RNA: ≤ 5 μg poly(A) <sup>+</sup> RNA: ≤ 1 μg
RNase free water	Up to 20 μl

- \*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 μl 进行反转, 可根据实际情况在 1~2 μl 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 μl。
- \*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 μM。

2. 合成 cDNA 反应条件:

30°C	5 min <sup>*1</sup>
55°C <sup>*2</sup>	15 min <sup>*3</sup>
85°C <sup>*4</sup>	5 min <sup>*4</sup>
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 分钟的去活反应。

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 μl
Random 6 mers Primer (100 μM) <sup>*1, *2</sup>	2 μl
Template RNA	Total RNA: ≤5 μg poly(A)* RNA: ≤1 μg
RNase free water	Up to 20 μl

- \*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 μl 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 μl。
- \*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 μM。

2. 合成 cDNA 反应条件:

30°C	5 min <sup>*1</sup>
50°C <sup>*2</sup>	15 min <sup>*3</sup>
85°C	5 min <sup>*4</sup>
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。