Version 1

Code No. AG11766

Evo Super M-MLV 反转录预混型示踪试剂盒（含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR，红色）

Evo Super M-MLV RT Mix Tracking Kit with gDNA Clean for qPCR (Red)

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.

ACCURATE BIOLOGY 艾科瑞生物

➢ 产品概述

本产品使用了经基因改造的反转录酶突变体 *Evo Super M-MLV*，该反转酶反转速度快，可在 3 min 内快速完成反转录。本产品包含反转录反应所需的所有组分，反转的 cDNA 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。

本产品中 5X *Evo Super M-MLV* RT Reaction Mix（Red）含有红色染料，可实现移液可视化，反转录获得的 cDNA 呈现红色，可搭配不同定量试剂使用：

- ❖ 可搭配添加了蓝色染料的 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒（含示踪染料）（Code No. AG11733）使用，**红色 cDNA 加入至蓝色的 qPCR 反应液中，颜色会发生变化，**可根据颜色变化确认是否添加模板，有利于大量样品的加样，降低漏加试剂概率。
- ❖ 也可搭配本公司其他的定量试剂使用【如 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒（Code No. AG11701）】。

本产品中的 gDNA Clean Reaction Mix Ⅱ可高效去除残留的基因组 DNA，进一步确保实验结果的准确性；同时，本产品中配有 NRT Control Reaction Mix Ⅱ，可用于配制无反转录酶的阴性对照反应。本产品适用于下列不同的操作方法，客户可以根据需求进行选择：

- ❖ **方法一：两步法（先去除基因组 DNA，再进行反转录）**：若提取的 RNA 中基因组 DNA 残留过多或对基因组 DNA 去除效果要求更高，建议使用此方法。
- ❖ **方法二：All in one（去除基因组 DNA 与反转录反应在一管中同时进行）：**此方法操作简便、快捷，可简化实验操作步骤，缩短实验时长，同时去除 RNA 中残留的基因组 DNA。

➢ 产品组成

组分名称	AG11766 (100 rxns / 20 μl)
gDNA Clean Reaction Mix Ⅱ *1	120 μl
5X *Evo Super M-MLV* RT Reaction Mix (Red) *2	400 μl
NRT Control Reaction Mix Ⅱ *3	80 μl
RNase free water	1 ml x 2 pcs

*1：gDNA Clean Reaction Mix Ⅱ可搭配 5X *Evo Super M-MLV* RT Reaction Mix(Red)或 NRT Control Reaction Mix Ⅱ使用，若未搭配 NRT Control Reaction Mix Ⅱ使用，gDNA Clean Reaction Mix Ⅱ会有剩余。

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

*3：该溶液不含 *Evo Super M-MLV* RTase ，其余组分与 5X *Evo Super M-MLV* RT Reaction Mix(Red) 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

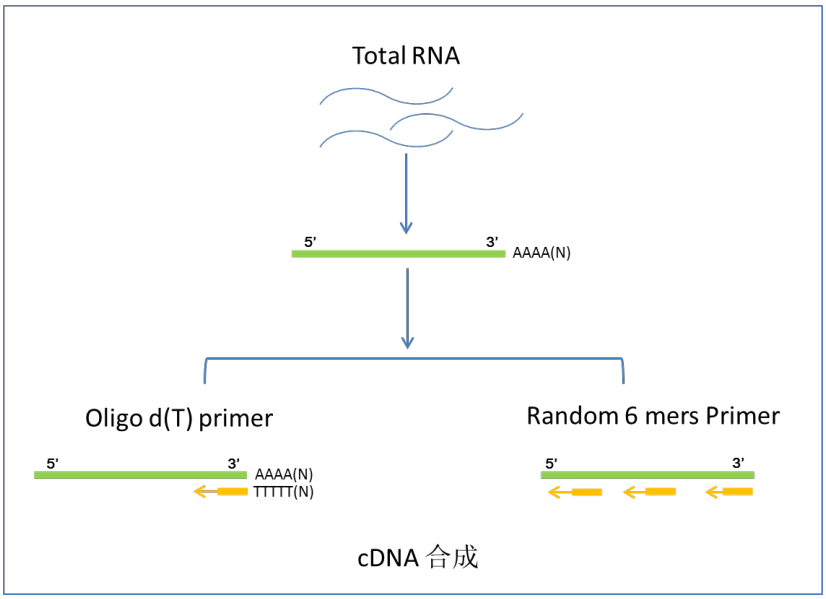
➢ 产品优势

1. 反转录速度快：可在 3 min 内完成反转录反应。
2. 移液可视化：试剂中含有红色染料，加样更加轻松，降低漏加试剂概率。
3. 基因组 DNA 消除性能强：本产品含基因组 DNA 去除试剂 gDNA Clean Reaction Mix Ⅱ，能够快速的去除 RNA 模板中混有的基因组 DNA。
4. 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，先去除基因组 DNA，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 DNA 与反转录反应，操作更加方便。
5. 杂质耐受性强：对 RNA 中残留的抑制剂具有良好的抗性。

➢ 实验原理

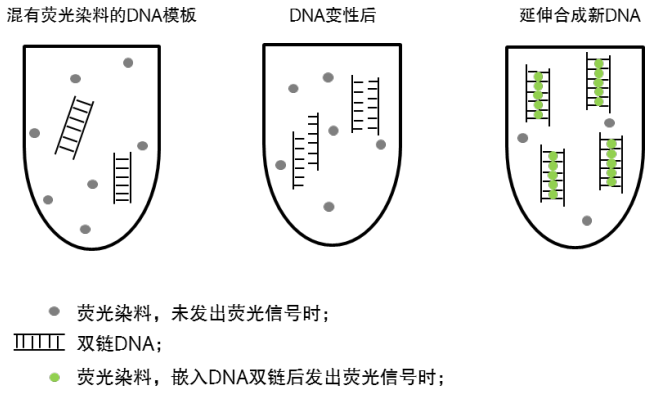
1. 反转录的原理

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

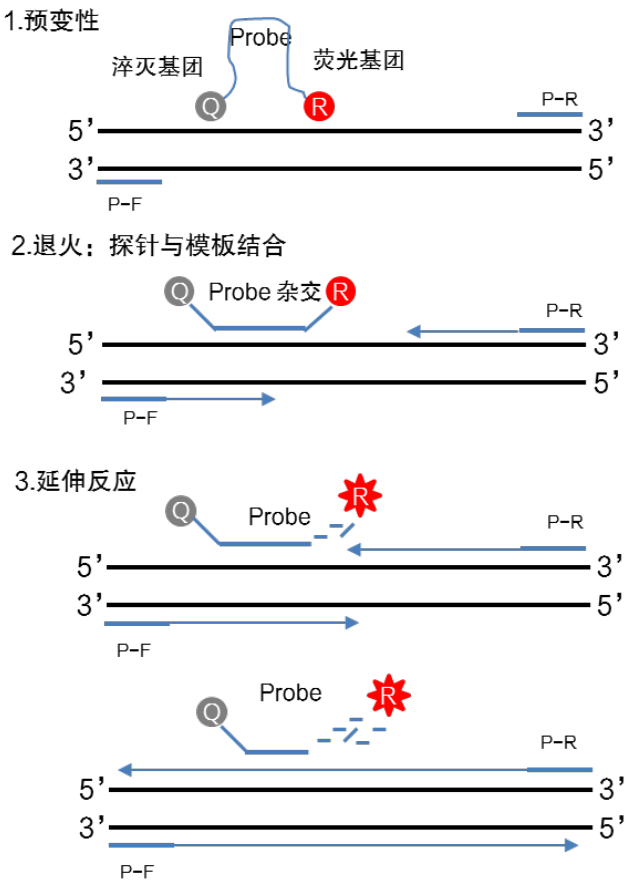
SYBR Green I 荧光染料嵌合法利用 SYBR Green I 与双链 DNA 结合后发出荧光的原理，首先将荧光染料 SYBR 加入定量 PCR 反应液中，在定量 PCR 扩增的延伸过程中，SYBR Green I 可以嵌合到双链 DNA 双螺旋小沟区域并发出荧光，此时通过检测反应进程中的荧光信号值，达到对靶标基因进行定性/定量分析的目的。



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 Ⅱ、5X *Evo Super M-MLV* RT Reaction Mix（Red）和 NRT Control Reaction Mix Ⅱ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. 多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. **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 30℃、42℃、50℃和 85℃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. 去除基因组 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 中的基因组 DNA。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（先去除基因组 DNA，再进行反转录）：

1）去除基因组 DNA

按照下表在冰上配制好反应液[*1、*2]，进行基因组 DNA 去除反应。

组分名称	反应体系
gDNA Clean Reaction Mix Ⅱ	1 μl
Total RNA[*3]	-
RNase free water	up to 16 μl

反应条件：42 ℃　2 min
　　4 ℃　Hold[*4]

*1：配制试剂时，建议先将 gDNA Clean Reaction Mix Ⅱ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。

*2：反应体系可以根据需要进行调整，各组分按比例变更即可。

*3：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 μl 反转录体系中，建议 Total RNA 加入量不超过 1 μg。

*4：反应产物取出后置于冰上，立即加入 4 μl 5X *Evo Super M-MLV* RT Reaction Mix（Red）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好反应液[*1]，置于 PCR 仪进行反转录反应。

组分名称	反应体系
步骤 1）反应液	16 μl
5X *Evo Super M-MLV* RT Reaction Mix（Red） 或 NRT Control Reaction Mix Ⅱ[*2]	4 μl
RNase free water	–
Total	20 μl[*1]

反应条件：	30 ℃	1 min
	50 ℃	3 min[*3]
	85 ℃	1 min[*4]
	4 ℃	Hold[*5]

*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：NRT Control Reaction Mix Ⅱ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 Super M-MLV* RT Reaction Mix（Red）替换成 NRT Control Reaction Mix Ⅱ即可。

*3：一般情况下反转时间 3 min 均能获得较好结果，也可根据实验需求在 1 min ~ 10 min 内调整，如反转 RNA 比较复杂导致扩增 CT 值较大，可将反转录时间延长至 10 min。

*4：通常使用 85℃，1 min 对反转录酶进行灭活，若有快速反应的需求，也可将灭活时间缩短至 5 sec。

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

方法二：All in one（去除基因组 DNA 与反转录反应同时进行）：

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

按照下表在冰上配制好反应液[*1、*2]，同时进行基因组 DNA 去除与反转录反应。

组分名称	反应体系
gDNA Clean Reaction Mix Ⅱ	1 μl
5X *Evo Super M-MLV* RT Reaction Mix（Red） 或 NRT Control Reaction Mix Ⅱ[*3]	4 μl
Total RNA[*4]	–
RNase free water	up to 20 μl

反应条件：		
	30 ℃	1 min
	50 ℃	3 min[*5]
	85 ℃	1 min[*6]
	4 ℃	Hold[*7]

*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、5X *Evo Super M-MLV* RT Reaction Mix（Red）或 NRT Control Reaction Mix Ⅱ、gDNA Clean Reaction Mix Ⅱ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 Reaction Mix Ⅱ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 Super M-MLV* RT Reaction Mix（Red）替换成 NRT Control Reaction Mix Ⅱ即可。

*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 20μl 反转录体系中，建议 Total RNA 加入量不超过 1μg。

*5：一般情况下反转时间 3 min 均能获得较好结果，也可根据实验需求在 1 min ~ 10 min 内调整，如反转 RNA 比较复杂导致扩增 CT 值较大，可将反转录时间延长至 10 min。

*6：通常使用 85℃，1min 对 MMLV 酶进行灭活，若有快速反应的需求，也可将灭活时间缩短至 5 sec。

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

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	20μl 体系
2X SYBR Green *Pro Taq* HS Premix	1X	10μl
cDNA[*1]	-	2μl
Primer F (10μM)[*2]	0.2μM[*2]	0.4μl
Primer R (10μM)[*2]	0.2μM[*2]	0.4μl
RNase free water		up to 20μl

*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：引物使用终浓度通常为 0.2μM，当反应结果不好时可以在 0.1~1.0μM 范围内调整。

两步法 qPCR 扩增程序[*1、*2]

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	30 sec[*3]	1
变性	95℃	5 sec	40
退火和延伸[*5]	60℃[*4]	30 sec[*4]	
熔解曲线采集[*6]	95℃	15 sec	1
	60℃	1 min	
	95℃	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 Tm 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℃，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。

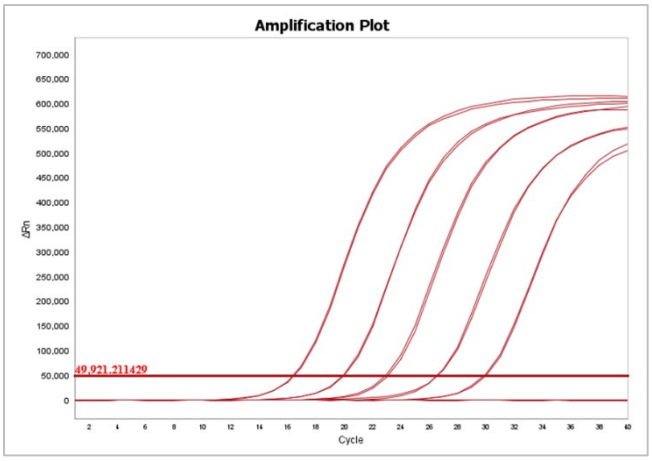
*5：此步骤进行荧光信号值采集。

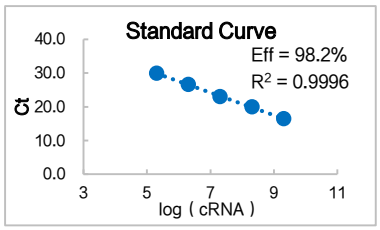
***6：此步为必须步骤，此熔解曲线为 ABI QuantStudio™5 Real-Time PCR Systems Standard 模式下默认程序。但仪器类型不同，熔解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。**

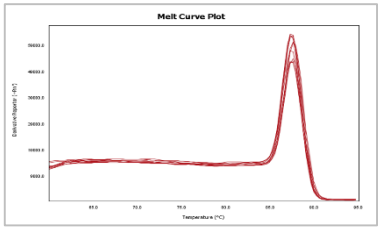
➢ 实验例

1、 向 293T Cell Total RNA（分别为 200 ng、20 ng、2 ng、200 pg、20 pg、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）**，并以此 cDNA 为模板，取 2μl 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=0.9996，扩增效率是 98.2%。

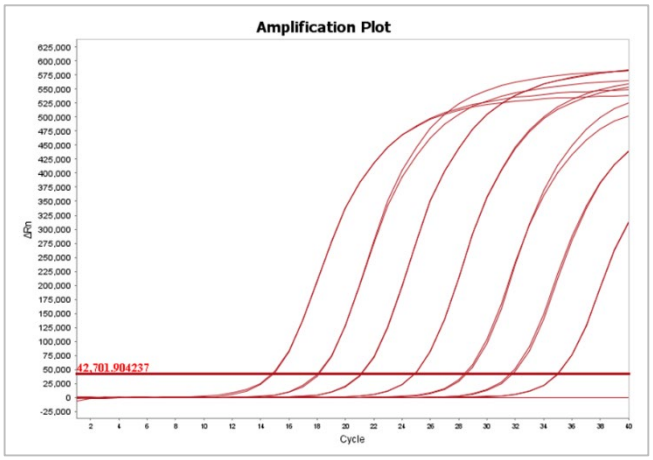
2、本产品的反转效率高，能在宽广的模板范围内进行准确的定量，200ng ~ 20 pg Total RNA 反转录获得的 cDNA 扩增曲线呈现良好的线性关系。

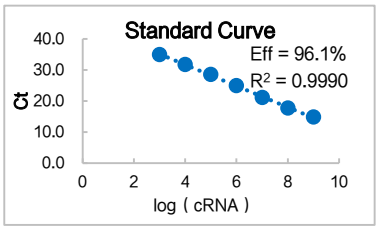
3、不添加 RNA 但添加基因组 DNA 样品中，Ct 值在 35 cycles 以内没有检出。

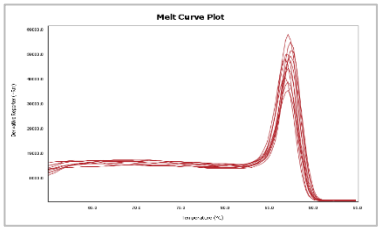
4、熔解曲线峰型单一，扩增特异性好。

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 1μg、100ng、10ng、1ng、100pg、10pg、1 pg、0 pg。以反转录产物 cDNA 为模板，取 2μl 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=0.9990，扩增效率是 96.1%。

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，1μg ~ 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、不添加 RNA 样品中，Ct 值在 35 cycles 以内没有检出。

4、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. 基因组 DNA 的去除

❖ 在进行下游定量 PCR 实验中，Total RNA 中混入的基因组 DNA 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 Ⅱ能够在反转录之前去除 RNA 模板中的基因组 DNA，保证定量结果的准确性。

❖ 如果 RNA 模板中基因组 DNA 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 中基因组 DNA 含量很高，或者对基因组 DNA 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。该方法对基因组 DNA 的消除性能强于**方法二：All in one**。

❖ 当 RNA 质量较高（基因组 DNA 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。