Version 1

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)

Code No. AG11766

包装量： 100 rxns / 20 μl
保存温度： -20℃

➢ 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

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

➢ 注意事项

1. 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。
2. 所有反应混合液建议在冰上配制。

➢ 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，客户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，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*2

反应条件：42 ℃　2 min
4 ℃[*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，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 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，也可根据需求在 1 min ~ 10 min 内调整，若反转 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 ℃，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。

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

*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

经上述反转录得到的 cDNA 可以直接进行定量 PCR 分析，其加入量不要超过定量 PCR 反应体积的 1/10 (V/V)。

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.