Version 1

Code No. AG11767

4X *Evo Super M-MLV* 一管式反转录预混型示踪试剂盒(含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR，红色)

4X *Evo Super M-MLV* All-in-One 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*，该反转录酶反转速度快，可在 3 min 内快速完成反转录。**本产品为 All-in-One Mix，包含反转与消除性能所需的所有组分，可在一管内同时进行基因组 DNA 消除与反转录反应，减少实验操作步骤。**本产品的 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 4X *Evo Super M-MLV* RT Mix with gDNA Clean（Red）中包含红色示踪染料，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）】。

➢ 产品组成

组分名称	AG11767 （100 rxns / 20 μl）
4X *Evo Super M-MLV* RT Mix with gDNA Clean（Red）*1	500 μl
RNase free water	1 ml x 2 pcs

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

➢ 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

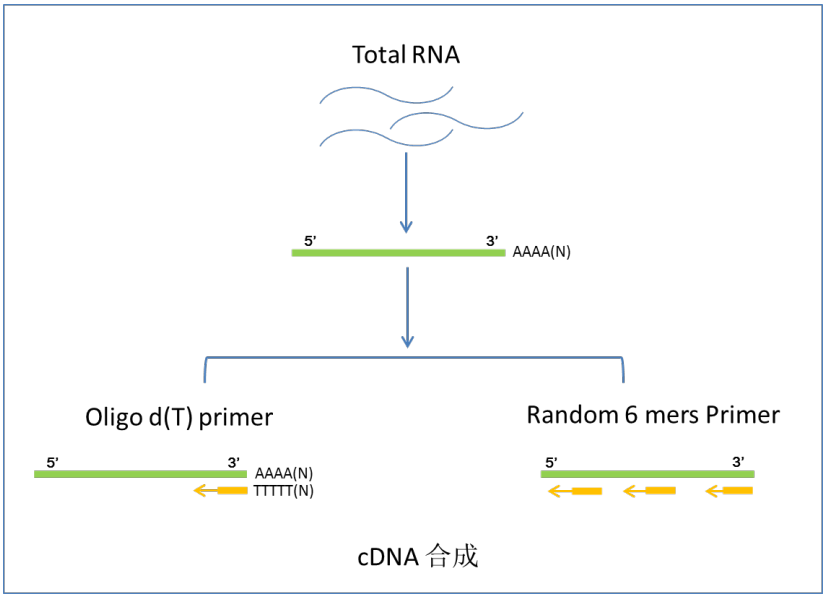
➢ 产品优势

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. 操作方便：可一步法同时进行基因组 DNA 消除与 RNA 反转录反应。
4. 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

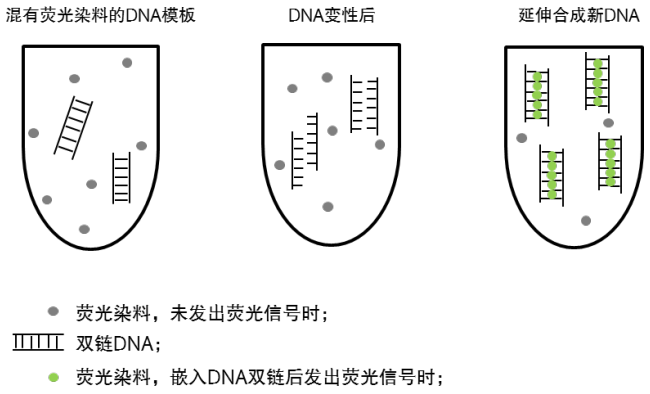
1. 反转录的原理

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

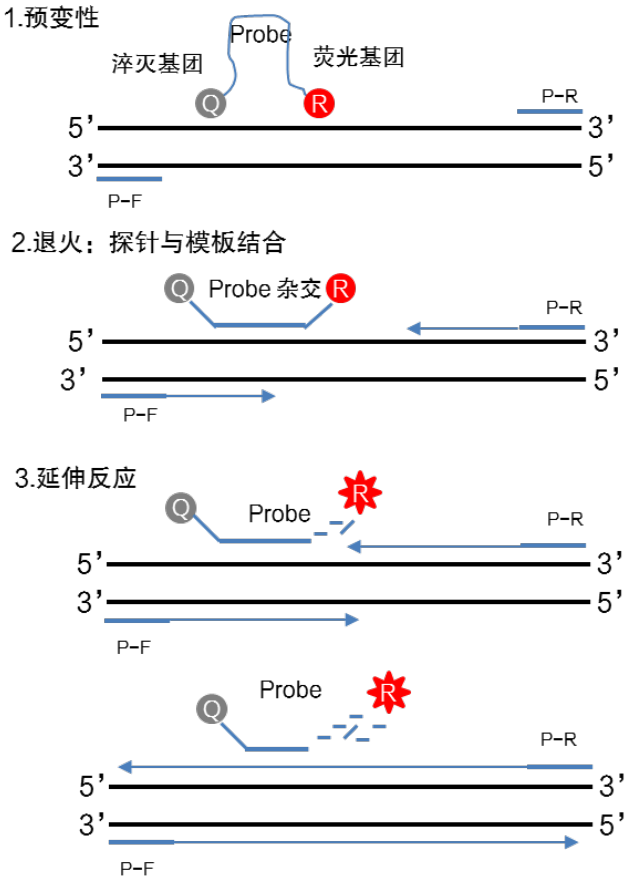
SYBR Green I 荧光染料嵌合法利用 SYBR Green I 与双链 DNA 结合后发出荧光的原理，首先将荧光染料 SYBR 加入定量 PCR 反应液中，在定量 PCR 扩增的延伸过程中，SYBR Green I 可以嵌合到双链 DNA 双螺旋小沟区域并发出荧光，此时通过检测反应进程中的荧光信号值，达到对靶标基因进行定性/定量分析的目的。



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. 4X *Evo Super M-MLV* RT Mix with gDNA Clean（Red）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℃、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

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

组分名称	反应体系
4X *Evo Super M-MLV* RT Mix with gDNA Clean（Red）	5 μl
Total RNA[*2]	–
RNase free water	up to 20 μl

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：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。

*3：一般情况下反转时间 3 min 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：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	20 μl 体系
2X SYBR Green *Pro Taq* HS Premix	1X	10 μl
cDNA*1	-	2 μl
Primer F (10 μM)*2	0.2 μM*2	0.4 μl
Primer R (10 μM)*2	0.2 μM*2	0.4 μl
RNase free water		up to 20 μl

*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 0.2 μM，当反应结果不好时可以在 0.1~1.0 μM 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。

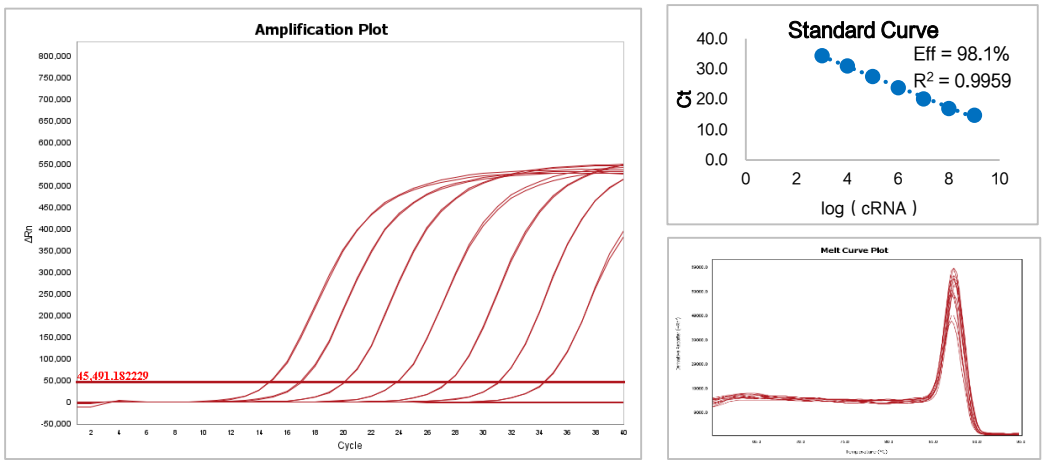
*5：此步骤进行荧光信号值采集。

***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、 使用本产品对 293T Total RNA 进行反转录，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 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=0.9959，扩增效率是 98.1%。

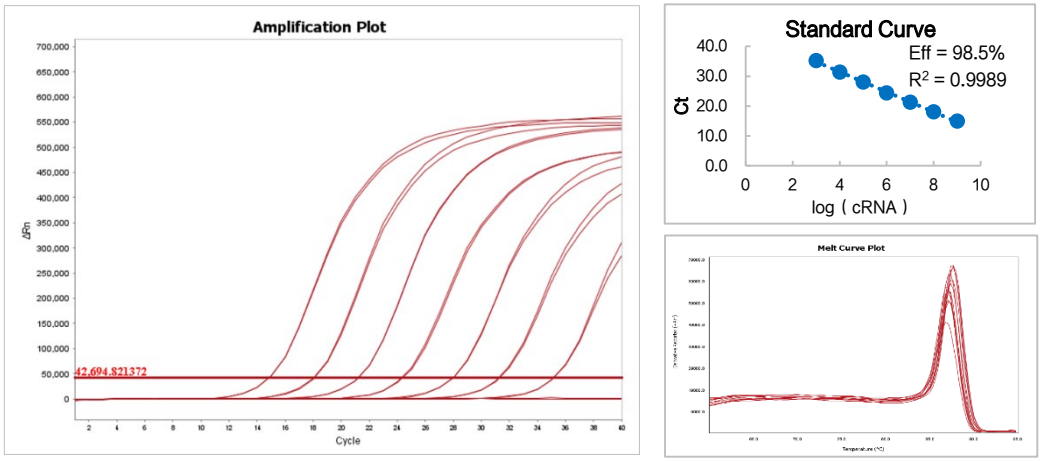
2、本产品的反转效率高，能在宽广的模板范围内进行准确的定量，1μg ~ 1 pg Total RNA 反转录获得的 cDNA 扩增曲线呈现良好的线性关系。

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。

2、 使用本产品对 Mouse Liver Total RNA 进行反转录，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=0.9989，扩增效率是 98.5%。

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

❖ 如果 RNA 模板中基因组 DNA 残留太多，使用本产品无法获得良好的实验结果，建议使用本公司产品 *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)（Code No. AG11766）中的**方法一：两步法**操作进行实验。

3. 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。