Version 5

Code No. AG11706

Evo M-MLV 反转录试剂预混液(用于 qPCR)

Evo M-MLV RT Premix for qPCR

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

本产品是 Real Time RT-PCR 专用的反转录试剂预混液。使用了延伸能力较强的 *Evo M-MLV* 反转录酶，只需要 15 min 即可有效合成 cDNA，合成得到的 cDNA 可用于嵌合法和探针法 qPCR 分析。5X *Evo M-MLV* RT Master Mix 含有反转录反应所需的所有组分，只需加入 RNA 模板与水即可直接进行反应，使用方便，可减少试剂损失及实验误差。

本产品针对 Oligo dT (18T) Primer、Random 6 mers Primer 用量进行了优化，使反转录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。

➢ 产品组成

组分名称	AG11706 (200 rxns / 10 μ l)
5X *Evo M-MLV* RT Master Mix *1	400 μ l
RNase free water	1 ml x 2 pcs

*1：含有 *Evo M-MLV* RTase、RNase Inhibitor、dNTP、Oligo dT (18T) Primer、Random 6 mers Primer、反应 Buffer

➢ 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

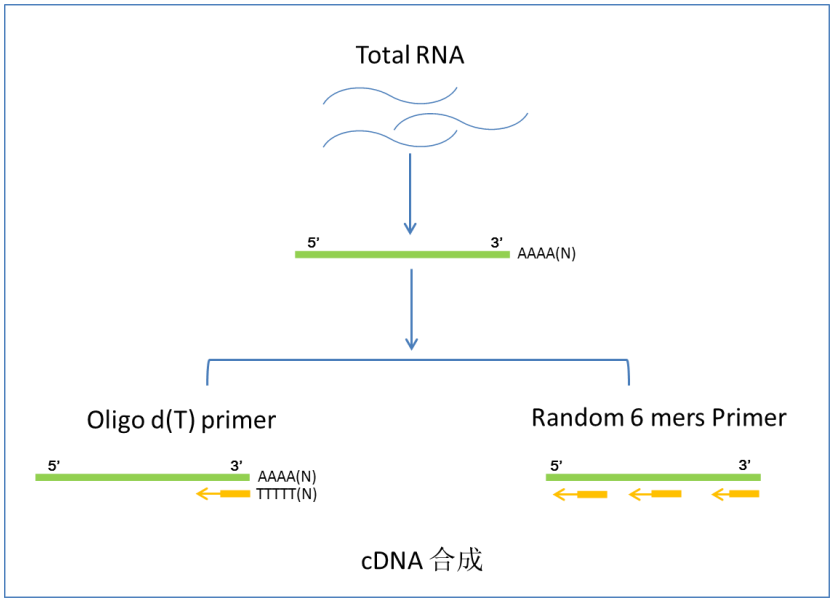
1. 可快速高效合成 cDNA，仅需 15min 就可合成 cDNA，可用于嵌合法和探针法 qPCR 分析。
2. 本产品为预混 Premix，只需加入 RNA 模板与水即可直接进行反应。
3. 本产品针对 Oligo dT (18T) Primer、Random 6 mers Primer 用量进行了优化，使反转录产物兼容嵌合法和探针法 qPCR 分析。

➢ 实验原理

1. 反转录的原理

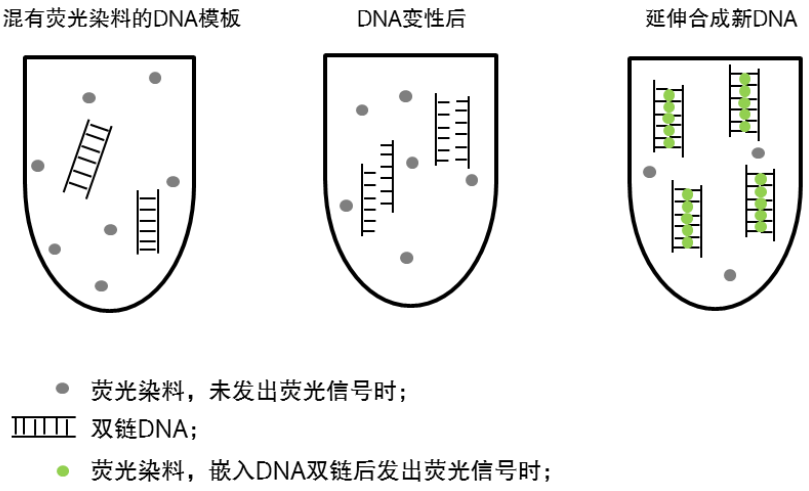
反转录是以 RNA 为模板，通过加入引物和反转录酶合成 cDNA 的过程，其中随机引物 Random Primer 适用于长的或具有发卡结构的 RNA 反转录，Oligo dT Primer 适用于有

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

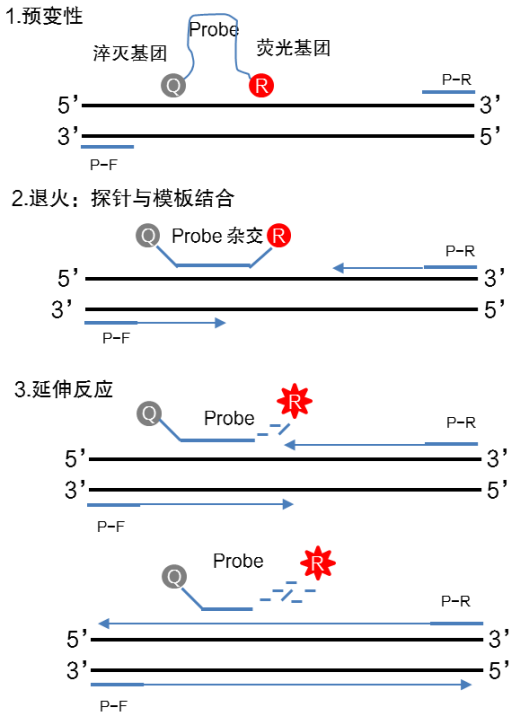
SYBR Green I 荧光染料嵌合法利用 SYBR Green I 与双链 DNA 结合后发出荧光的原理，首先将荧光染料 SYBR 加入 PCR 反应液中，在 PCR 扩增的延伸过程中，SYBR Green I 可以嵌合到双链 DNA 双螺旋小沟区域并发出荧光，此时通过检测反应进程中的荧光信号值，达到对靶标基因进行定性/定量分析的目的。



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 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 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，达到对目的基因进行定量分析的目的。



➢ 使用前注意事项

1. 5X *Evo M-MLV* RT Master Mix 粘度较高，使用前先离心，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. 反应混合液需要在冰上配制。
3. cDNA 产物适用于定量 PCR 反应，不适用于长片段基因调取，如有需要，可选用本公司其他相关产品。
4. 选用 SYBR 法和探针法进行实验时需要注意反转录反应中 Total RNA 的用量。
5. 本产品不含有去除基因组的成分，如有需要，可使用 DNase I（RNase Free）（Code No. AG12001）进行操作。
6. 本产品是由 RNA 制备 cDNA 的反转录试剂盒，进行反转录反应时需要使用灭菌的器具，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。

➢ 实验前准备

1. PCR 仪（或 37℃、85℃的水浴或加热块）
2. 1.5 ml 离心管（RNase free）、0.2 ml PCR 管（RNase free）
3. 冰盒
4. 移液器、枪头（RNase free）

➢ 操作方法

1. 配制反转录反应液

反应液配制在冰上进行[*1]

组分名称	加入量
5X *Evo M-MLV* RT Master Mix	2 μl
Total RNA[*2]	–
RNase free water	up to 10 μl

反应条件：37 ℃ 15 min
85 ℃ 5 sec
4 ℃[*3] Hold[*3]

*1：RT 反应液配制过程中要注意轻柔混匀。

*2：RNA 量可根据需要添加。在 10 μl 反转录体系中，使用 SYBR Green qPCR 法时，建议最多使用 500 ng Total RNA；使用探针法时，建议最多使用 1 μg Total RNA。

*3：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 7500 Real-Time PCR System 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	0.4 μl
Primer R (10 μM)[*2]	0.2 μM	0.4 μl
ROX Reference Dye (4 μM)[*3]	0.08 μM	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：引物通常使用终浓度为 0.2 μM，当反应结果差时可以在 0.1～1.0 μM 范围内调整。

*3：如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准，请按照仪器推荐量添加；若不需要使用 ROX 的 PCR 仪，ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。

两步法 PCR 反应程序[*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	60℃[*4]	30 sec[*4]	
信号采集	Dissociation stage		

*1：建议首先采用两步法 PCR 反应程序，如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件

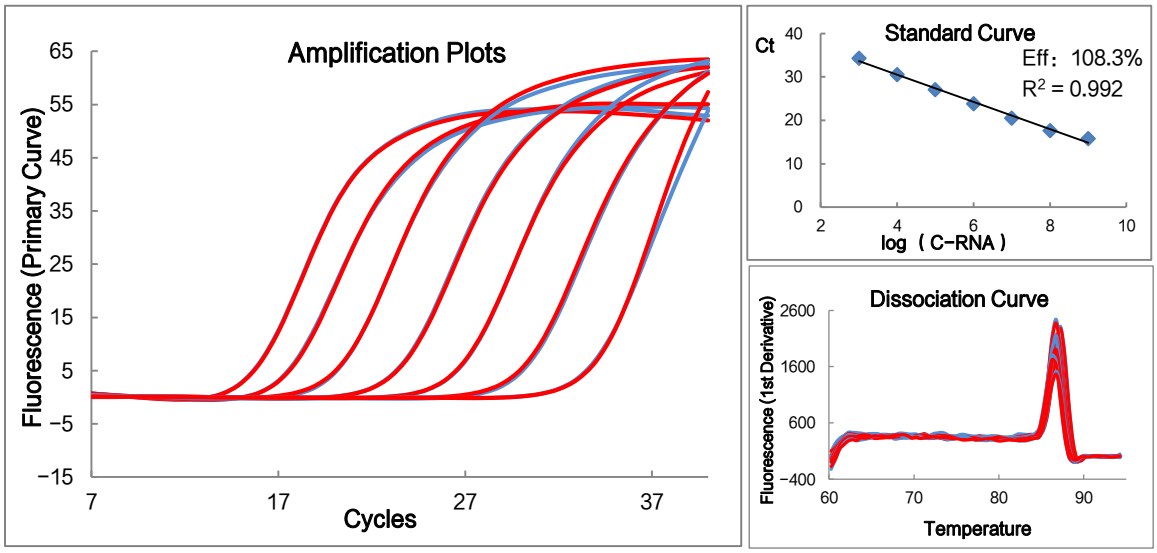
*2：如果引物 Tm 值较低，导致两步法扩增效率较差，可采用三步法进行 PCR 扩增。

*3：预变性时间通常设定为 30 sec，如果模板变性困难，可以延长预变性时间至 30 sec ~ 2 min。

*4：通常情况下 PCR 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 PCR 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 PCR 扩增。

➢ 实验例

1. 使用本产品对小鼠 Total RNA 进行反转录，RNA 起始量 1μg~1 pg。再以此 cDNA 为模板，取 2μl 的 cDNA 原液，通过嵌合法 qPCR 检测小鼠 *GAPDH* 基因（本实验例 qPCR 使用 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒, Code No. AG11701 进行）。

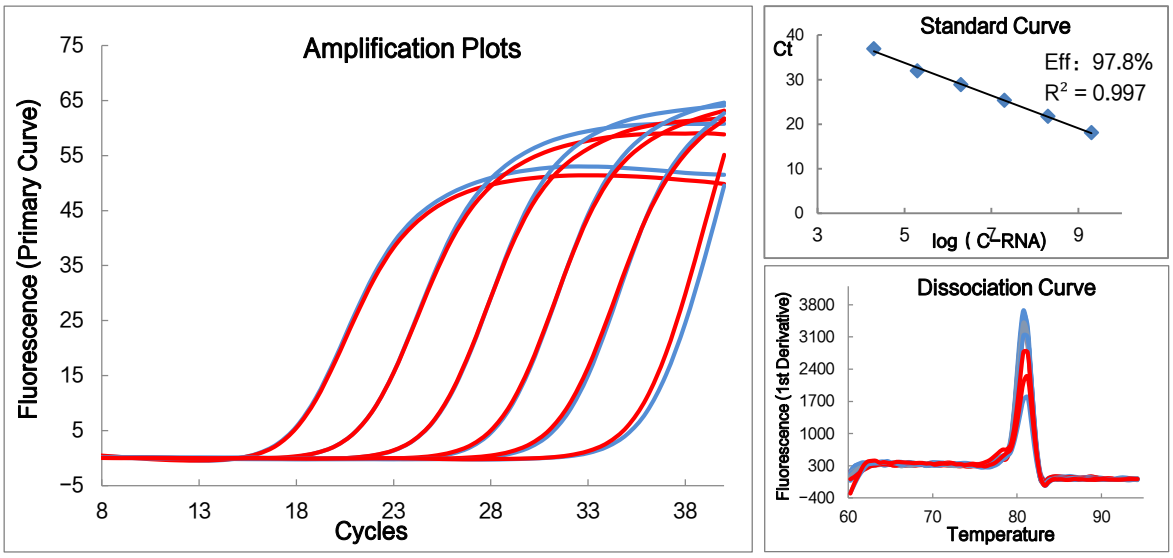


结果如上图所示：1、扩增效率为 108.3%，R^2=0.992；

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、熔解曲线峰型单一，扩增特异性好。

2. 使用本产品对293T细胞的Total RNA进行反转录，RNA起始量1μg~10 pg。再以此cDNA为模板，取2μl的cDNA原液，通过嵌合法qPCR检测Human *TFRC* 基因（本实验例qPCR使用SYBR Green *Pro Taq* HS预混型qPCR试剂盒, Code No. AG11701进行）。

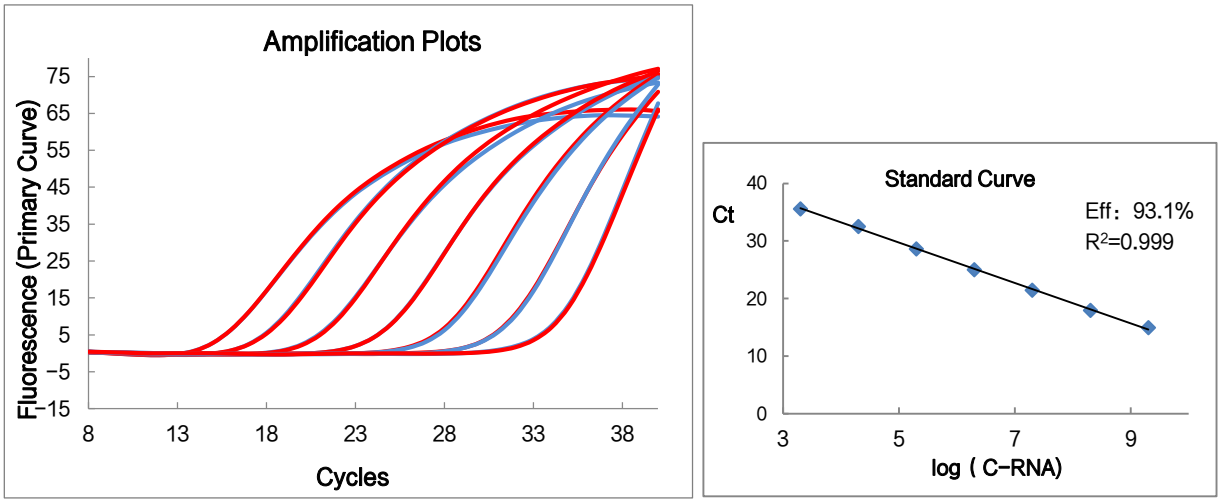


结果如上图所示：1、扩增效率为97.8%，R^2=0.997；

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 ~ 10 pg Total RNA反转录获得的cDNA扩增曲线呈现良好的线性关系；

3、熔解曲线峰型单一，扩增特异性好。

3. 使用本产品对293T细胞的Total RNA进行反转录，RNA起始量1μg ~1 pg。再以此cDNA为模板，取2μl的cDNA原液，利用探针法qPCR检测Human *β-actin* 基因（qPCR使用 *Pro Taq* HS预混型探针法qPCR试剂盒, Code No. AG11704进行）。



结果如上图所示：1、扩增效率为93.1%，R^2=0.999；

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。

➢ 产品注意事项

1. **保证模板的完整性及纯度**

❖ RNA 的完整性：如果模板中含有 RNase，降解 RNA，将会影响 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，如操作者佩戴手套和口罩，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逆转录酶的活性。

2. **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。