

Version 5

Code No. AG11728

***Evo M-MLV* 反转录预混型试剂盒
(含去除 gDNA 试剂, 用于 qPCR) Ver.2**

***Evo M-MLV* RT Mix Kit
with gDNA Clean for qPCR Ver.2**

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.



➤ 产品概述

本产品是利用 *M-MLV* 反转录酶的反转录试剂盒，cDNA 产物可直接用于 qPCR 检测。5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 中包含反转录反应所需的所有组分，并针对 Oligo dT (18T) Primer、Random 6 mers Primer 用量进行了优化，使反转录产物兼容染料嵌合法和探针法 qPCR 检测，能够进行高效的基因表达分析。

在进行下游定量 PCR 实验中，Total RNA 中混入的基因组 DNA (gDNA) 可直接作为反应的模板进行扩增，可能会造成实验结果的假阳性。本产品中 gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 可有效去除残留的基因组 DNA，确保定量结果的准确性；同时，本产品中配有 NRT Control Reaction Mix，可用于配制无反转录酶的阴性对照反应。

Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒 (含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR) Ver.2 是在原有 *Evo M-MLV* 反转录预混型试剂盒 (含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR) 的基础上进行优化升级，适用于不同的操作方法，客户可以根据需求进行选择：

- 1) **方法一：两步法 (先去除 gDNA，再进行反转录)**：若提取的 RNA 中 gDNA 残留过多或对 gDNA 去除效果要求更高，建议使用此方法。
- 2) **方法二：All in one (去除 gDNA 与反转录反应在一管中同时进行)**：当 RNA 质量较高 (gDNA 残留少)，或反应中 RNA 浓度较高、目标基因拷贝数高时，可选用此方法，操作简便、快捷，可简化实验操作步骤，缩短实验时长。

➤ 产品组成

| 组分名称 | AG11728 (100 rxns / 20 μl) |
|---|-------------------------------|
| gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 ^{*1} | 240 μl |
| 5X <i>Evo M-MLV</i> RT Reaction Mix Ver.2 ^{*2} | 400 μl |
| NRT Control Reaction Mix ^{*3} | 80 μl |
| RNase free water | 1 ml x 2 pcs |

*1: gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 可搭配 5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 或 NRT Control Reaction Mix 使用，若未搭配 NRT Control Reaction Mix 使用，gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 会有剩余。

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

*3: 该溶液不含 *Evo M-MLV* RTase，其余组分与 5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 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

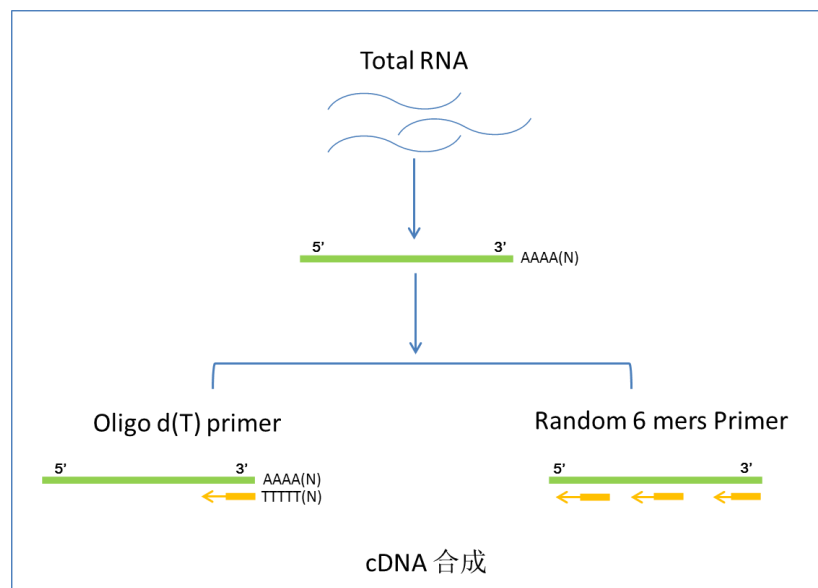
➤ 产品优势

1. 本产品中含有 gDNA 去除试剂 gDNA Clean Reaction Mix Ver.2，能够快速去除 RNA 模板中混有的 gDNA。
2. 本产品中将去除基因组及反转录所需试剂分别配制成预混液，使用方便，可减少试剂损失及实验误差。
3. 本产品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 gDNA，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与反转录反应，操作方便快捷。
4. 经本产品反转得到的 cDNA 同时适用于 SYBR 法和探针法 qPCR 分析。

➤ 实验原理

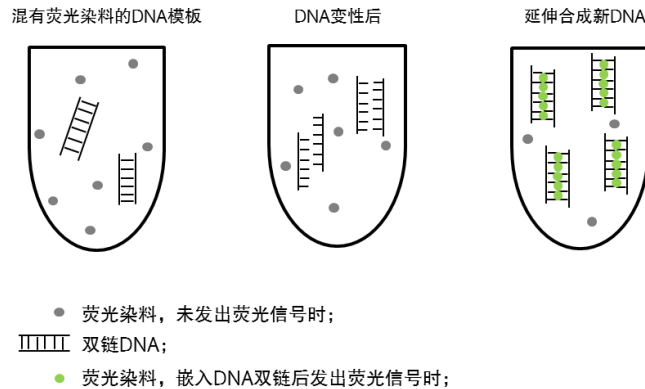
1. 反转录的原理

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

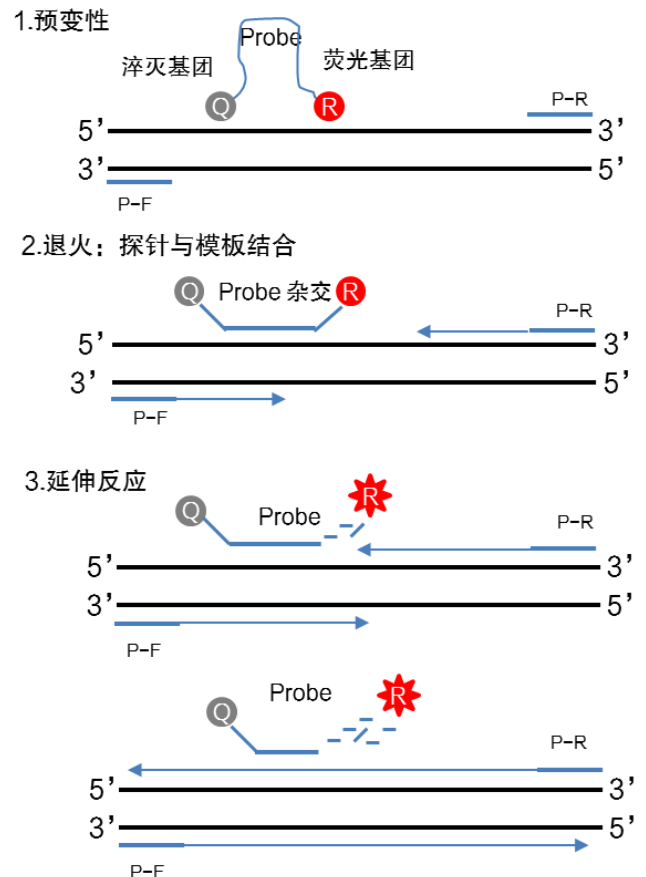
SYBR Green I 荧光染料嵌合法利用 SYBR Green I 与双链 DNA 结合后发出荧光的原理，首先将荧光染料 SYBR 加入定量 PCR 反应液中，在定量 PCR 扩增的延伸过程中，SYBR Green I 可以嵌合到双链 DNA 双螺旋小沟区域并发出荧光，此时通过检测反应进程中的荧光信号值，达到对靶标基因进行定性/定量分析的目的。



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 Ver.2、5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 和 NRT Control Reaction 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，并用移液枪轻柔吸打混匀（避免起泡），然后再进行使用。
3. 需要几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. 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，可使用本公司其他相关产品。

➤ 实验前准备

1. PCR 仪（或 37°C、42°C 和 85°C 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 gDNA。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 gDNA，再进行反转录）：

1) 去除 gDNA

按照下表配制反应液^{*1、*2}，进行基因组 DNA 去除反应。

| 组分名称 | 体系 1 ^{*3} | 体系 2 ^{*3} |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 | 2 μl | 2 μl |
| Total RNA ^{*4} | - | - |
| RNase free water | up to 10 μl | up to 16 μl |

反应条件: 42 °C 2 min

4 °C^{*5} 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: 配制试剂时, 建议先将 gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 与 RNase free water 配制成分混液, 用移液器轻柔吸打混匀后, 再加入 RNA 模板。

*3: 体系 1 (10 μl 体系) 与体系 2 (16 μl 体系) 可按需求进行选择。若 RNA 浓度较低, 可选择体系 2, 增加 RNA 的加入量, 将反应体积增大, 补加 RNase free water 至 16 μl 进行反应, 同时, 省略下述**步骤 2**) 反转录反应中 RNase free water 的添加。若 RNA 浓度较高, 体系 1 与体系 2 均可选择。

*4: Total RNA 可以根据需要添加, 提取的 RNA 建议使用 RNase free water 进行溶解。在 20 μl 反转录体系中, 使用 SYBR 法进行 qPCR 扩增时, 建议 Total RNA 加入量不超过 1 μg; 使用探针法进行 qPCR 扩增时, 建议 Total RNA 加入量不超过 2 μg。

*5: 反应产物取出后置于冰上, 待**步骤 2**) 预混液配制完成后立即加入至上述反应产物中, 进行后续反转录反应。

2) 反转录反应

配制反转录反应液^{*1}, 置于 PCR 仪进行反转录反应。

| 组分名称 | 体系 1 ^{*2} | 体系 2 ^{*2} |
|---|--------------------|--------------------|
| 步骤 1) 反应液 | 10 μl | 16 μl |
| 5X <i>Evo M-MLV</i> RT Reaction Mix Ver.2 ^{*3} | 4 μl | 4 μl |
| RNase free water | 6 μl | - |
| Total | 20 μl | 20 μl |

反应条件: 37 °C 15 min

85 °C 5 sec

4 °C^{*4} Hold^{*4}

*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: 若按体系 1 配制反转录反应液时, 可将 5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 和 RNase free water 预先配制成分混液, 再分装 10 μl 到上述**步骤 1**) 的 10 μl 反应液中, 用移液器轻柔吸打混匀后进行反转录反应; 若按体系 2 配制反转录反应液时, 直接添加 4 μl 的 5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 至上述**步骤 1**) 的 16 μl 反应液中, 用移液器轻柔吸打混匀后进行反转录反应。

*3: 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 M-MLV* RT Reaction Mix Ver.2 替换成 NRT Control Reaction Mix 即可。

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

方法二：All in one (去除 gDNA 与反转录反应同时进行)：

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

按照下表配制反应液^{*1、*2}，同时进行基因组 DNA 去除与反转录反应。

| 组分名称 | 加入量 |
|--|------------------|
| gDNA Clean Reaction Mix Ver.2 | 2 μ l |
| 5X <i>Evo M-MLVRT</i> Reaction Mix Ver.2 ^{*3} | 4 μ l |
| Total RNA ^{*4} | - |
| RNase free water | up to 20 μ l |
| 反应条件：37 $^{\circ}$ C 15 min | |
| 85 $^{\circ}$ C 5 sec | |
| 4 $^{\circ}$ C ^{*5} 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：配制试剂时，建议加样顺序按照 RNase free water、gDNA Clean Reaction Mix Ver.2、5X *Evo M-MLVRT* Reaction Mix Ver.2 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 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 M-MLVRT* Reaction Mix Ver.2 替换成 NRT Control Reaction Mix 即可。

*4：Total RNA 可以根据需要添加，提取的 RNA 建议使用 RNase free water 进行溶解。在 20 μ l 反转录体系中，使用 SYBR 法进行 qPCR 扩增时，建议 Total RNA 加入量不超过 1 μ g；使用探针法进行 qPCR 扩增时，建议 Total RNA 加入量不超过 2 μ g。

*5：反应产物如立即用于后续 qPCR 反应，可暂放于 4 $^{\circ}$ C 或冰上；如短期保存建议放置于 -20 $^{\circ}$ C；如长期保存建议放置于 -80 $^{\circ}$ C。

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 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 μ l 体系 |
|--|---------------------------|------------------|
| 2X SYBR Green <i>Pro Taq</i> HS Premix | 1X | 10 μ l |
| cDNA ^{*1} | - | 2 μ l |
| Primer F (10 μ M) ^{*2} | 0.2 μ M ^{*2} | 0.4 μ l |
| Primer R (10 μ M) ^{*2} | 0.2 μ M ^{*2} | 0.4 μ l |
| RNase free water | | Up to 20 μ l |

- *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 μ M, 当反应结果不好时可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整。

两步法 qPCR 扩增程序^{*1、*2}

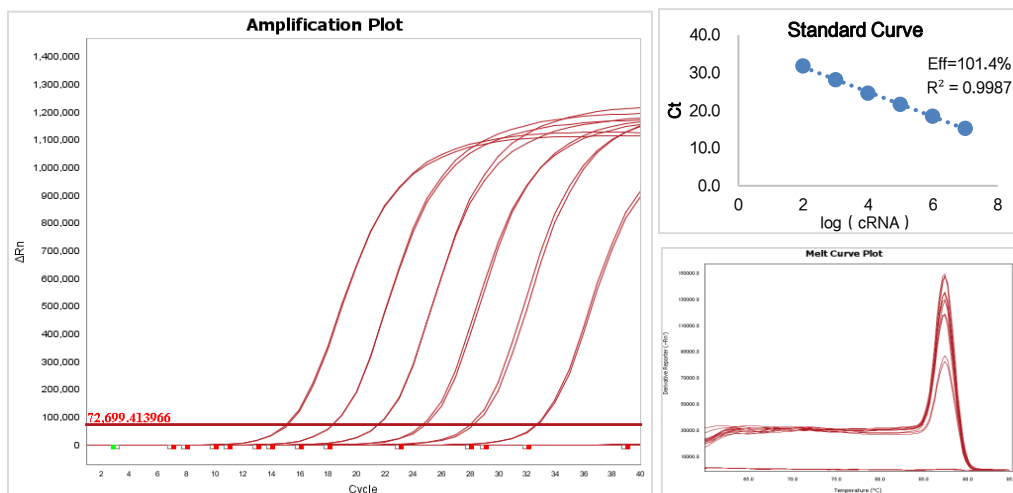
| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|---------------------|--------------------|----------------------|------|
| 预变性 | 95°C | 30 sec ^{*3} | 1 |
| 变性 | 95°C | 5 sec | } 40 |
| 退火和延伸 ^{*5} | 60°C ^{*4} | 30 sec ^{*4} | |
| 溶解曲线采集步骤 | Dissociation stage | | |

- *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 T_m 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°C, 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。

➤ 实验例

- 1、向 293T Cell Total RNA (分别为 200 ng、20 ng、2 ng、200 pg、20 pg、2 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: 两步法的体系 1**), 并以此 cDNA 为模板, 取 2 μ l 的 cDNA 原液, 用 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 $R^2=0.9987$ ，扩增效率是 101.4%。

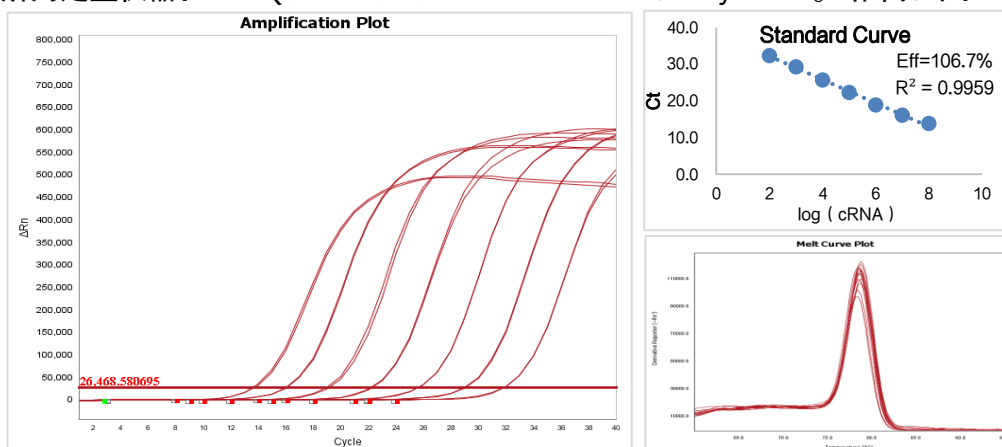
2、不添加 RNA 但添加 gDNA 样品中，Ct 值在 35 cycles 以内没有检出。

3、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 ~ 2 pg Total RNA 反转录获得的 cDNA 扩增曲线呈现良好的线性关系。

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 1 μ g、100ng、10ng、1ng、100pg、10pg、1 pg。以反转录产物 cDNA 为模板，取 2 μ l 的 cDNA 原液，用 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 $R^2=0.9959$ ，扩增效率是 106.7%。

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，1 μ g ~ 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。

➤ 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. gDNA 的去除

- ❖ 在进行下游定量 PCR 实验中，Total RNA 中混入的 gDNA 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 Ver.2 能够在反转录之前去除 RNA 模板中的 gDNA，保证定量结果的准确性。
- ❖ 如果 RNA 模板中 gDNA 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 gDNA 含量很高，或者对 gDNA 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。
- ❖ 当 RNA 质量较高（gDNA 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。