

Version 1

Cat No. AG11734

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

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

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* 反转录聚合酶的反转录试剂盒，cDNA 产物可直接用于 qPCR 检测。该制品中 5X gDNA Clean Reaction Mix 可去除残留的基因组 DNA，保证定量结果的准确性；5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix (Yellow) 含有黄色染料，能够实现反转录移液可视化，避免漏加试剂，且该试剂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，使反转录产物兼容嵌合法和探针法 qPCR 分析，能够进行高效的基因表达分析。

5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix (Yellow) 含有黄色染料，反转录获得的 cDNA 呈现黄色，可搭配不同定量试剂使用：

- 1) 可以搭配添加了蓝色染料的 SYBR® Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Tracking Kit (Code. AG11733) 使用，避免移液错误，实现模板移液过程可视化：将本制品反转录获得的 cDNA (黄色) 加入至蓝色的 qPCR 反应液中，溶液会变成绿色，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，减少了误操作概率。
- 2) 可搭配本公司其他的定量试剂使用【如 SYBR® Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit (Code. AG11701) 】, 当黄色 cDNA 加入至无色定量试剂中，会变成浅黄色，可实现移液可视化。但若 cDNA 原液加入量较少，颜色变化不明显，可能会无法辨别。
- 3) 其他公司定量产品搭配本品使用性能未经验证，如需使用，请先测试性能。

➤ 产品组成

组分名称	AG11734 (100 rxns / 20 μ l)
5X gDNA Clean Reaction Mix	200 μ l
5X <i>Evo M-MLV</i> RT Reaction Mix (Yellow) *1	400 μ l
RNase free water	1 ml x 2 pc

*1: 含有 *Evo M-MLV* RTase、RNase Inhibitor、dNTPs、Oligo dT (18T) Primer、Random 6 mers Primer 和黄色染料。

➤ 保存

保存温度：-20°C

运输温度：干冰或者-20°C冰袋

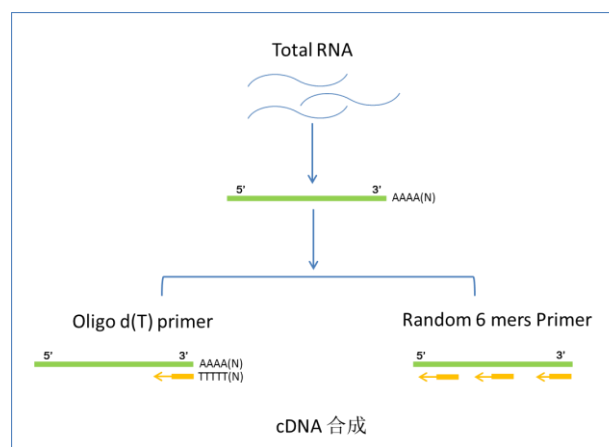
➤ 产品优势

1. 本制品含有黄色染料，反转时可实现移液可视化。
2. 反转录获得的 cDNA 呈现黄色：可搭配蓝色的 SYBR® Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Tracking Kit (Code. AG11733) 使用，实现模板移液过程可视化，避免移液错误，提高加样效率，降低误操作概率。也可搭配本公司其他定量试剂使用。
3. 含有基因组 DNA 去除试剂 5X gDNA Clean Reaction Mix，能够快速去除 RNA 模板中混有的基因组 DNA。
4. 本试剂盒将去除基因组及反转录体系分别配制成预混液，使用方便，可减少试剂损失及实验误差。
5. 本制品反转得到的 cDNA 同时可以适用于 SYBR 法和探针法 qPCR 分析。

➤ 实验原理

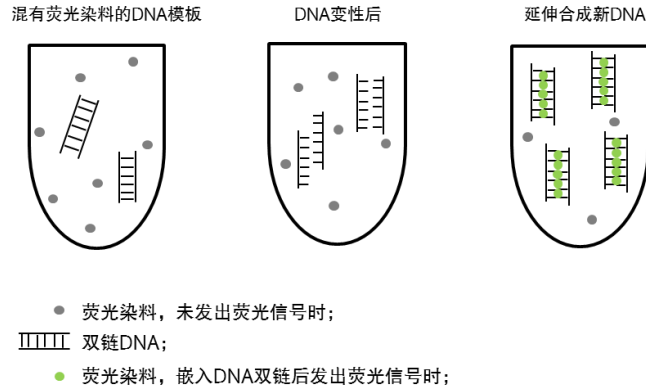
1. 反转录的原理

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 PolyA 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：



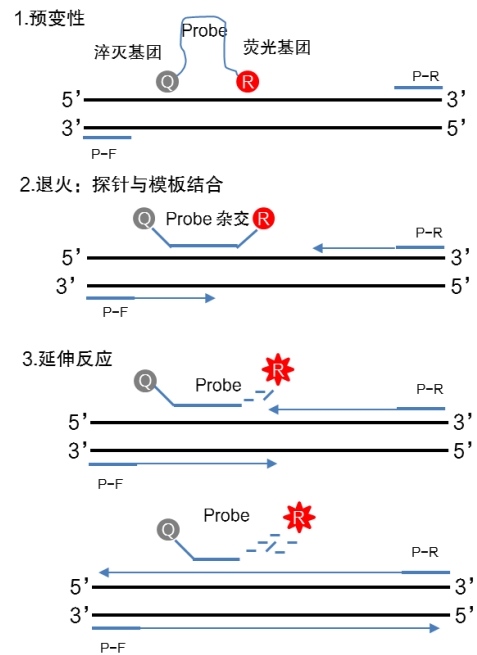
2. qPCR 反应原理

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。



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, 达到对目的基因进行定量分析的目的。



➤ 使用前注意事项

- 5X gDNA Clean Reaction Mix 与 5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix (Yellow) 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。
- 需要几个样本同时进行检测时, 应先配制各种试剂的混合液, 然后分装到每个反应管中。
- 所有反应混合液需要在冰上配制。
- 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。

- 本品是由 RNA 制备 cDNA 的反转录试剂盒，进行反转录反应时需要注意防止 RNase 污染，需要使用灭菌的器具，操作过程中要避免说话，且需要穿实验服，戴一次性手套等防止 RNA 被污染或降解。

➤ 实验前准备

1. PCR 仪 (或 37°C、42°C水浴和 85°C加热块)
2. RNase free 1.5 ml 离心管、PCR 管
3. 冰浴或冰盒
4. 移液器、枪头 (RNase free)

➤ 操作步骤

本试剂盒是针对 qPCR 分析前去除 RNA 中的基因组 DNA 后，进行反转录合成 cDNA 的试剂盒，使用制品进行反转录时主要包括 2 个步骤：去除基因组 DNA 和反转录反应。如需进行下一步 qPCR 反应，可配合本公司定量相关产品使用。操作如下：

1) 去除基因组 DNA。按照下表在冰上配制反应液，进行基因组 DNA 去除反应。

组分名称	加入量
5X gDNA Clean Reaction Mix	2 μ l
Total RNA ^{*1}	-
RNase free water	up to 10 μ l

反应条件：42 °C 2 min
 4 °C -

*1: RNA 量可根据需要添加。在 20 μ l 反转录体系中，使用 SYBR 法进行 qPCR 扩增时，最多使用 1 μ g Total RNA；使用探针法进行 qPCR 扩增时，最多使用 2 μ g Total RNA。

2) 反转录反应。配制 RNA 模板溶液，置于 PCR 仪进行变性、退火反应。

组分名称	加入量
步骤 1) 反应液	10 μ l
5X <i>Evo M-MLV</i> RT Reaction Mix (Yellow) ^{*2}	4 μ l
RNase free water ^{*2}	6 μ l
Total	20 μ l ^{*3}

反应条件: 37 °C 15 min
 85 °C 5 sec
 4 °C -

*2: 配制反转录反应时, 这两种溶液可以预先配制成 Master Mix, 再分装 10 μl 到上述步骤 1) 的 10 μl 反应液中, 轻轻混匀后进行反转录反应, 也可将 5X *Evo M-MLV* RT Reaction Mix (Yellow) 及 RNase free water 分别添加至上述步骤 1) 的 10 μl 反应液中。

*3: 反转录反应体系可以根据需要相应调整。

3) 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 Premix *Pro Taq* HS qPCR Tracking Kit (Code. AG11733) 为例, 具体操作如下: (注: 若使用其他定量产品, 请参照各自说明书操作。)

(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems 为例)

组分名称	20 μl 体系	50 μl 体系
2X SYBR® Green <i>Pro Taq</i> HS Premix (Blue) *4	10 μl	25 μl
cDNA *5, 6	≤2 μl	≤5 ul
Primer F (10 μM) *7	0.4 μl	1 μl
Primer R (10 μM) *7	0.4 μl	1 μl
ROX Reference Dye (4 μM) *8	0.4 μl	1 μl
RNase free water	Up to 20 μl *9	Up to 50 μl *9

*4: 该溶液避免反复冻融, 防止酶活降低; 使用前可上下颠倒混匀, 请勿 vortex 振荡混匀; 溶液中含有 SYBR® Green I, 操作过程中注意避免强光照射。

*5: cDNA 原液使用体积不要超过定量 PCR 反应总体积的 10%。必要时可以将模板进行梯度稀释, 以确定合适的模板添加量, 若出现荧光信号偏低的情况, 可尝试将 cDNA 原液稀释 2~10 倍后进行实验。

*6: cDNA 原液为黄色, 加入至蓝色的预混液中, 会变成绿色; 若加入的 cDNA 原液过少, 变色不明显, 可参考下表, 在 cDNA 溶液中补加一定的 40X Dilution Buffer (Yellow) 【该试剂为 SYBR® Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Tracking Kit (Code. AG11733) 的组分】。

不同体系每个反应中添加 40X Dilution Buffer (Yellow)量

反应体系	cDNA 原液加入量	40X Dilution Buffer (Yellow) 添加量
20 μl 体系	1 μl ~ 2 μl	/
	< 1 μl	0.4 μl
50 μl 体系	2.5 μl ~ 5 μl	/
	< 2.5 μl	1 μl

注: 其他反应体系请按比例增减。

- *7: 引物通常使用终浓度为 0.2 μM , 也可以在 0.1 - 1.0 μM 范围内调整。
- *8: 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。
- *9: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。

两步法 qPCR 扩增程序^{*10}

	温度	时间	循环数
Step 1	95°C	30 sec ^{*11}	1
Step 2	95°C	5 sec	} 40
	60°C	30 sec ^{*12}	
Step 3	Dissociation stage		

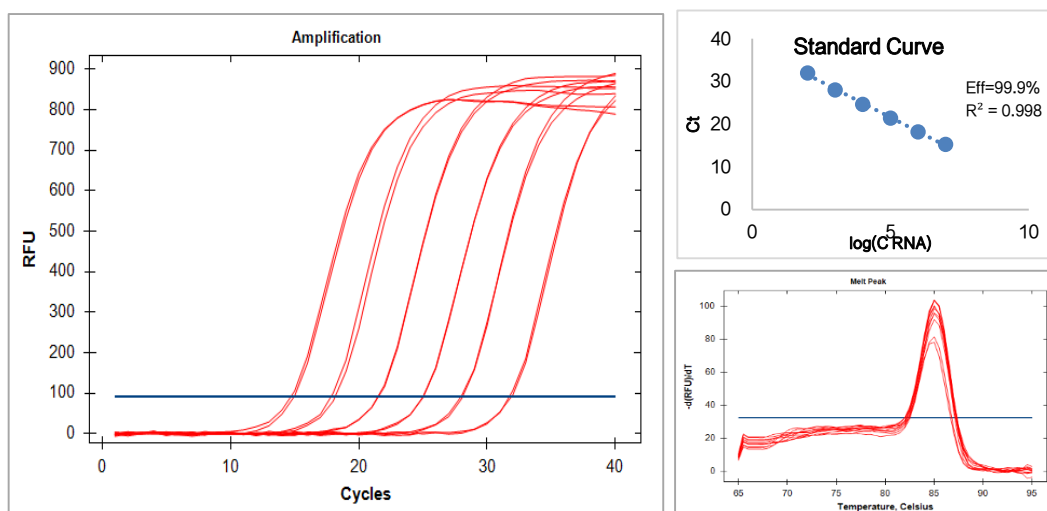
*10: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件; 如果引物 T_m 值较低, 导致两步法扩增效率较差, 可采用三步法进行 PCR 扩增 (三步法 PCR 反应程序可参考附录)。

*11: 预变性温度通常设定为 30 sec, 如果模板变性困难, 可以延长预变性时间至 1~2 min。

*12: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增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, 可适当提高退火温度; 如需提高扩增效率, 或 PCR 扩增产物较长, 则可将反应延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。

➤ 实验例

- 以小鼠肝脏 Total RNA (100 ng ~1 pg) 为模板, 使用本试剂盒去除基因组 DNA, 然后进行反转录实验, 并以此 cDNA 为模板, 取 2 μl 的 cDNA 原液, 用 SYBR® Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Tracking Kit (Code. AG11733) 进行 qPCR 扩增检测 *APOE 1* 基因。所用定量仪器: CFX96 Real-Time PCR Detection System。结果如下:

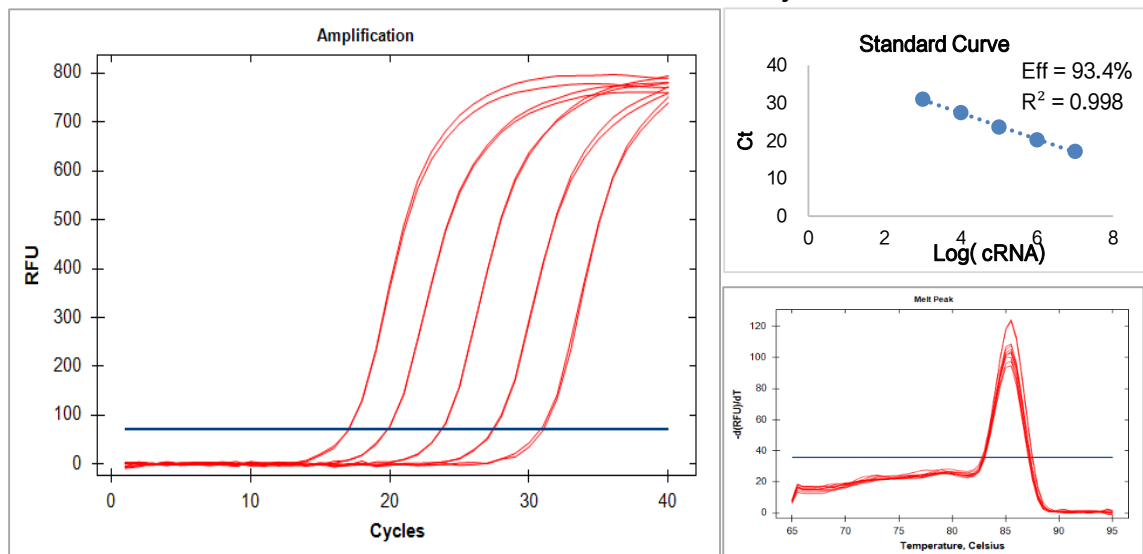


结果如上图所示：1、工作曲线 $R^2=0.998$ ，扩增效率为 99.9%；

2、本制品的反转效率高，能在宽广的模板范围内进行准确的定量，100 ng ~ 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、以 293T 细胞 Total RNA (100 ng ~10 pg) 为模板，使用本试剂盒去除基因组 DNA，然后进行反转录实验，并以此 cDNA 为模板，取 2 μ l 的 cDNA 原液，用 SYBR® Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Tracking Kit (Code. AG11733)进行 qPCR 扩增检测 β -actin 基因。所用定量仪器：CFX96 Real-Time PCR Detection System。结果如下：



结果如上图所示：1、工作曲线 $R^2=0.998$ ，扩增效率是 93.4%。

2、本制品的反转效率高，能在宽广的模板范围内进行准确的定量，100 ng ~ 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。

➤ 产品注意事项

1. 保证模板的完整性及纯度

- ❖ RNA 的完整性：如模板中含有 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，如操作者佩戴口罩和手套，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. 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 PCR 反应的模板进行扩增，造成实验结果的假阳性。因此在反转录之前需去除 RNA 模板中的 gDNA，保证用于定量 PCR 的模板中仅有 cDNA。可通过本试剂盒的 5X gDNA Clean Reaction Mix 去除 gDNA。

➤ 附录

三步法 PCR 反应程序：

步骤	温度	时间	循环数
Step 1	95°C	30 sec	1
Step 2	95°C	5 sec	40
	55°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
Step 3	Dissociation stage		