

Version 1

Code No. CM0265

Evo Super M-MLV 反转录聚合酶 I

Evo Super M-MLV Reverse Transcriptase I

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

Evo Super M-MLV 反转录聚合酶 I 是基于 M-MLV(莫洛尼鼠白血病病毒)进行基因改造的逆转录酶突变体, 并通过大肠杆菌重组表达系统纯化获得。

Evo Super M-MLV 反转录聚合酶 I 具有无 RNase H 活性、合成效率高、反应速度快、灵敏度高、热稳定性高、半衰期长和抗抑制能力强等特点。可在 42°C ~ 55°C 条件下高效合成 1st Strand cDNA, 其最佳的反应温度为 50°C, 对于复杂的模板也能很好的进行反转。同时本产品也适合于全长 cDNA 文库的构建等。

➤ 活性定义

以 Poly(A) 为模板, Oligo (dT) 为引物, 在 37°C 条件下, 10 分钟内催化掺入 1nmol 的 dTTP 所需酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

➤ 产品组成

组分名称	体积
<i>Evo Super M-MLV</i> RTase I (200U/μl)	100 μl
5X RTase Reaction Buffer*	800 μl

*: 5X RTase Reaction Buffer 组成:

250mM Tris-HCl (pH8.3 at 25°C), 375 mM KCl , 45 mM MgCl₂

➤ 保存及运输

保存温度: -20°C 保存

运输温度: 干冰运输或 -20°C 冰袋运输

➤ 产品优势

1. 热稳定性强: 可在 42°C ~ 55°C 条件下进行反转录反应, 其最适温度为 50°C, 有利于具有复杂二级结构 RNA 模板的合成。
2. 抗抑制能力强: 对 RNA 中残留的抑制剂 (如异硫氰酸胍、乙醇、EDTA 与血红素等) 具有良好的抗性。
3. 使用范围广: 适合 cDNA 的合成及全长 cDNA 文库构建。
4. 转录能力强: 可合成长达 13 kb 的 cDNA。
5. 转录速度快: 最快 5 min 内可完成反转录反应。

➤ 使用注意事项

1. *Evo Super M-MLV* RTase I 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，并用移液器轻柔吸打混匀（避免起泡），切勿剧烈振荡，避免其失活；使用时建议存放于冰盒内，使用完毕后建议立即置于 -20°C 保存。
2. 5X RTase Reaction Buffer 使用前请于冰上充分融化，短暂离心，将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失。
3. 操作时需注意防止实验环境和操作过程中的 RNase 污染。
4. 反应体系需要在冰上配制，最后将配制好的反应液放置于 PCR 仪中反应。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：

引物、水（RNase-free）、1.5 ml 离心管（RNase-free）、PCR 管（RNase-free）、枪头（RNase-free）、移液器。

2. 仪器：

PCR 仪、移液器、旋涡振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

➤ 操作方法

第一链 cDNA 合成：

1. 按照下表内容配制好 RNA 模板溶液，混合液配制好后置于 PCR 仪中进行变性、退火反应。（此过程有利于模板 RNA 的变性以及反转录引物和模板的特异性退火，可以提高反转录效率。）

组分名称	加入量
dNTP Mix (10mM each)	2 μl
Oligo dT Primer (2.5 μM) or Random 6 mers Primer (20 μM) or Specific Primer (2 μM)	1 μl
Template RNA ^{*1}	—
RNase free water	Up to 10 μl

*1: Total RNA 推荐用量： $\leq 5 \mu\text{g}$ ；mRNA 推荐用量： $\leq 1 \mu\text{g}$ 。

变性、退火反应条件：

65 $^{\circ}\text{C}$	5 min
4 $^{\circ}\text{C}$	—

2. 配制反转录反应体系，按照合成 cDNA 反应条件合成 cDNA:

组分名称	加入量
上述变性、退火后反应液	10 μ l
5X RTase Reaction Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor	20 U
<i>Evo Super M-MLV</i> RTase I (200U/ μ l)	0.5 μ l ^{*1}
RNase free water	Up to 20 μ l

*1: 一般情况下酶量添加 0.5 μ l 可以获得较好结果，但是可以根据实际情况在 0.25 μ l ~ 1 μ l 进行调整。如将该酶用于一步法 RT-qPCR 检测时，酶量可在 0.125 μ l ~ 1 μ l 范围内进行调整。

合成 cDNA 反应条件^{*1}:

50°C ^{*2}	5 ~ 30 min ^{*3}
85°C	5 min
4°C	-

*1: 如果使用 Random 引物进行反转录，需要在反应开始前进行 30°C 反应 10min 处理，可使 Random 引物与模板充分退火、延伸，增加反转录效率。

*2: 反转温度 50°C 可以获得较好结果，但可以根据需求在 42°C ~ 55°C 范围内进行调整，如模板比较复杂或者使用特异性下游引物进行反转录时，如结果不理想可将反应温度升高到 55°C。

*3: 一般情况下反转时间 15 min 均能获得较好结果，如果反转的长度 < 4kb，反转时间可根据需求在 5 min ~ 15 min 内调整，如反转 cDNA 长度较长或者模板较复杂，可适当延长时间至 30 min。

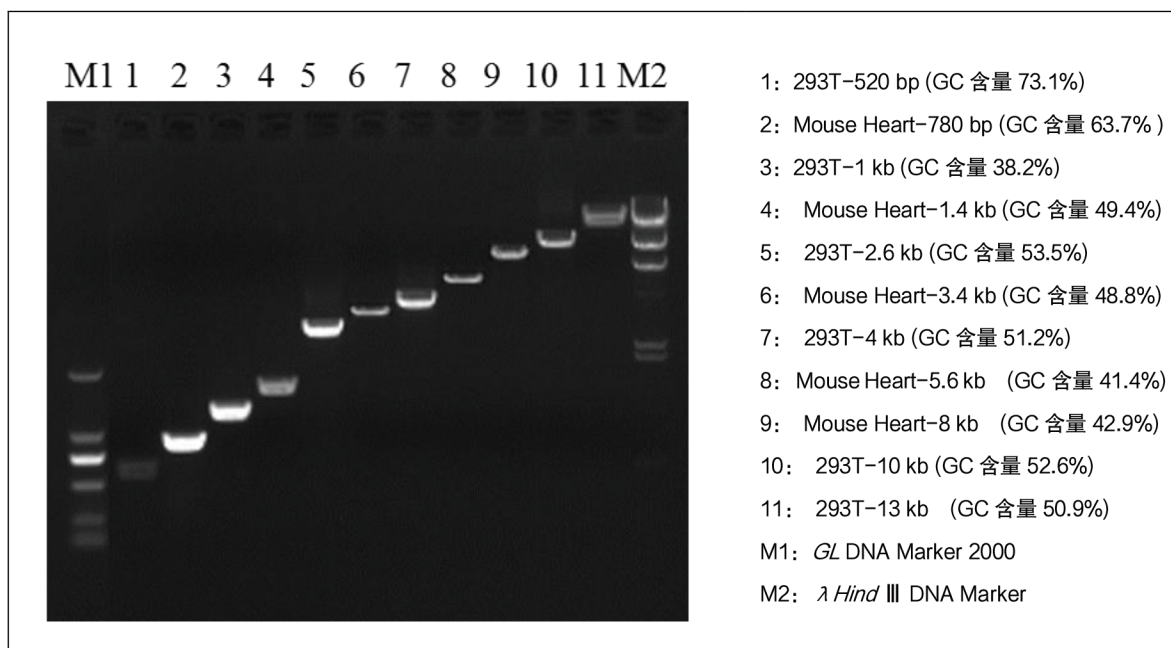
3. 上述得到的 cDNA 溶液可以直接用于后续 2nd Strand cDNA 合成及 PCR 扩增等。

【注：PCR 扩增时，上述反转录反应液用量不要超过 PCR 反应体系的 1/10】

➤ 实验例

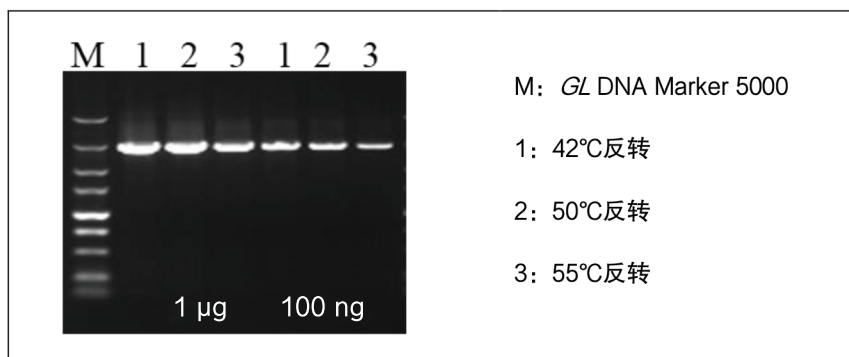
1. 以 293T 细胞 Total RNA 及 Mouse Heart RNA 为模板，使用本产品进行反转（反应温度为 50℃），后使用 2X *L-Exp Taq* Master Mix（Code No. AG11417）扩增不同长度的片段，均能得到较好的扩增效果。

电泳结果如下图所示：

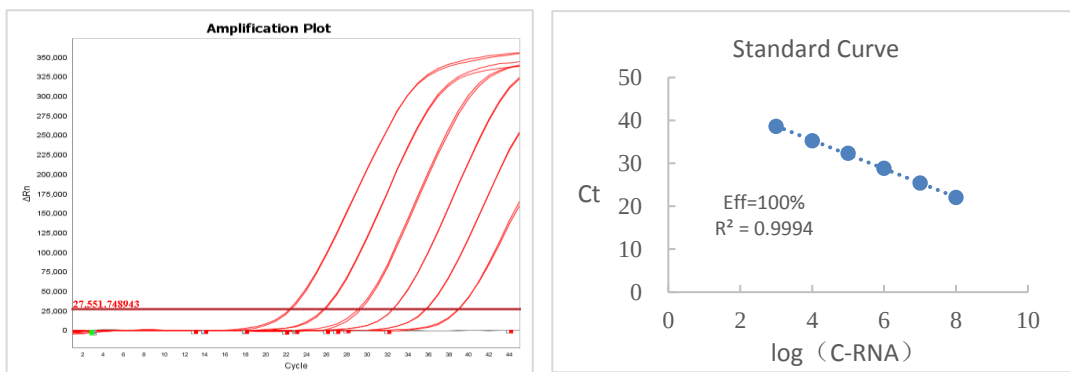


2. 以 293T 细胞 Total RNA 为模板（模板量为 1 μ g 与 100ng），使用本产品在不同温度（42℃、50℃、55℃）下进行反转后扩增 2.6 kb，结果表明：*Evo Super M-MLV* RTase I 在 42℃ ~ 55℃ 温度范围内均能很好的反转，推荐最适反转温度为 50℃。

电泳结果如下图所示：



3. 以 293T Total RNA (100 ng ~ 1 pg) 为模板, 用 RNase free water 代替模板作为阴性对照, 使用本产品进行反转, 反转产物搭配 2X Premix Probe qPCR Kit for ASFV (UNG Plus, Primer Free) (Code No. AG11731) 进行定量检测 (RPP30 基因, GC 含量为 62%, CY5 通道)。所用定量仪器为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。实验结果如下:



结果如上图所示:

- 1、不同浓度的模板在 45 cycles 以内均能获得良好的扩增。
- 2、阴性对照在 45 cycles 没有检出。
- 3、扩增效率为 100%, $R^2=0.9994$ 。

➤ 产品注意事项

1. 合适的模板

- ❖ 模板加入量降低时, 扩增效率降低, 扩增特异性升高; 模板加入量升高时, 扩增效率升高, 扩增特异性降低; 可根据实际情况调整模板加入量。
- ❖ 模板的纯度及完整性影响 PCR 反应, 采用高质量高纯度的 RNA 模板, 可提高 RT-PCR 反应的成功率, 降低外源污染。
- ❖ 模板降解或模板中含有抑制 RT-PCR 反应的物质等, 都可能会导致 RT-PCR 反应扩增效率降低, RT-PCR 反应产物产量减少, 建议更换模板, 重新实验。

2. 实验细节

- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡。
- ❖ 反应时需要使用已灭菌的器具, 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。
- ❖ 检查反应程序, 确保反应程序设置正确。