Version 1

Code No. CM0267

Evo Super M-MLV 反转录聚合酶 III

Evo Super M-MLV Reverse Transcriptase III

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

Evo Super M-MLV 反转录聚合酶 III 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 III 具有较高的热稳定性和宽广的反应温度 （42℃ ~ 65℃），同时具有较强的抗干扰能力，具有无 RNase H 活性、合成效率高、反应速度快、灵敏度高等特点。

Evo Super M-MLV 反转录聚合酶 III 可在 42℃ ~65℃条件下高效合成 1st Strand cDNA，其最佳的反应温度为 55℃，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℃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
Evo Super M-MLV RTase III（200U/μl）	100μl
5X RTase Reaction Buffer *	800μl

*：5X RTase Reaction Buffer 组成：

250mM Tris-HCl（pH8.3 at 25℃），375 mM KCl，45 mM $MgCl_2$

➢ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或-20℃冰袋运输

➢ 产品优势

1. 热稳定性强：可在 42℃ ~ 65℃条件下进行反转录反应，其最适温度为 55℃，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 片段 。
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 III 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℃ 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 μ l
Oligo dT Primer (2.5uM) or Random 6 mers Primer (20 uM) or Specific Primer (2uM)	1 μ l
Template RNA*1	–
RNase free water	Up to 10 μ l

*1：Total RNA 推荐用量：≤ 5 μ g；mRNA 推荐用量：≤ 1 μ g。

变性、退火反应条件：

65℃	5 min
4℃	–

2. 配制反转录反应体系，合成 cDNA：

组分名称	加入量
上述变性、退火后反应液	10 μl
5X RTase Reaction Buffer	4 μl
RNase Inhibitor	20 U
Evo Super M-MLV RTase III	0.5 μl[*1]
RNase free water	Up to 20 μl

*1：一般情况下酶量添加 0.5μl 可以获得较好结果，但是可以根据实际情况在 0.25 μl～1 μl 进行调整。如将该酶用于一步法 RT-qPCR 检测时，如结果不好可以将酶量在 0.025μl～0.25 μl 范围内进行调整。

合成 cDNA 反应条件[*1]：

55℃[*2]	15～30 min[*3]
85℃	5 min
4℃	–

*1：如果使用 Random 引物进行反转录，需要在反应开始前进行 30 ℃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 55℃可以获得较好结果，但可以根据需求在 42℃ ～65℃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 60℃ ～65℃。

*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。

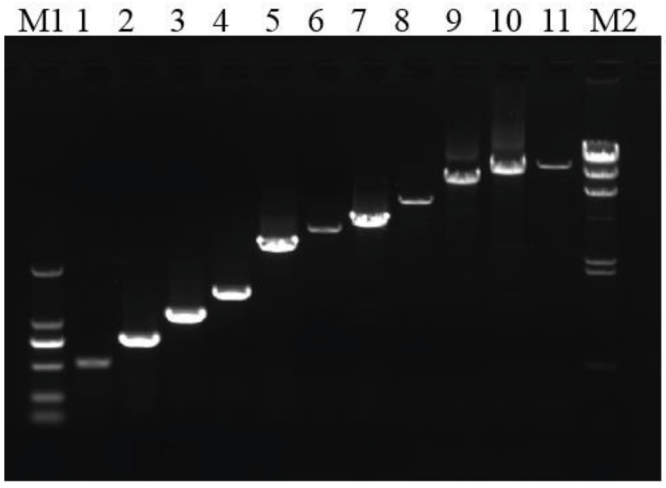
3. 上述得到的 cDNA 溶液可以直接用于后续 2nd Strand cDNA 合成及 PCR 扩增等。

【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 及鼠心 RNA 为模板，使用本产品进行反转（反应温度为 55℃），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。

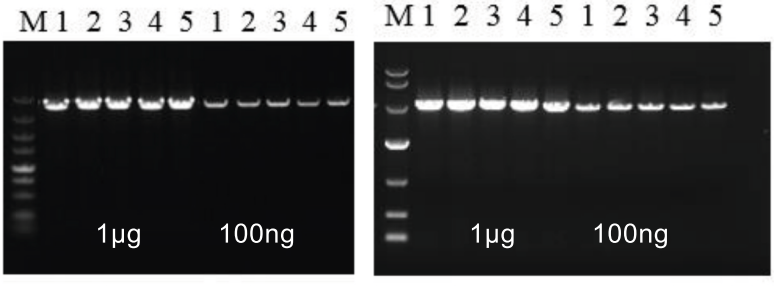
   电泳结果如下图所示：



1：293T-520 bp (GC 含量 73.1%)
2：Mouse Heart-780 bp (GC 含量 63.7%)
3：293T-1 kb (GC 含量 38.2%)
4： Mouse Heart-1.4 kb (GC 含量 49.4%)
5： 293T-2.6 kb (GC 含量 53.5%)
6： Mouse Heart-3.4 kb (GC 含量 48.8%)
7： 293T-4 kb (GC 含量 51.2%)
8： Mouse Heart-5.6 kb (GC 含量 41.4%)
9： Mouse Heart-8 kb (GC 含量 42.9%)
10： 293T-10 kb (GC 含量 52.6%)
11： 293T-13 kb (GC 含量 50.9%)
M1：*GL* DNA Marker 2000
M2：*λ Hind* Ⅲ DNA Marker

2. 以 293T 细胞 Total RNA 为模板（模板量为 1μg 与 100ng），使用本产品在不同温度（42℃、50℃、55℃、60℃、65℃）下进行反转后扩增不同片段（2.6kb 及 4kb），结果表明：*Evo Super M-MLV* RTase III 在 42℃ ~ 65℃温度范围内均有较好的反转性能，推荐最适反转温度为 55℃。

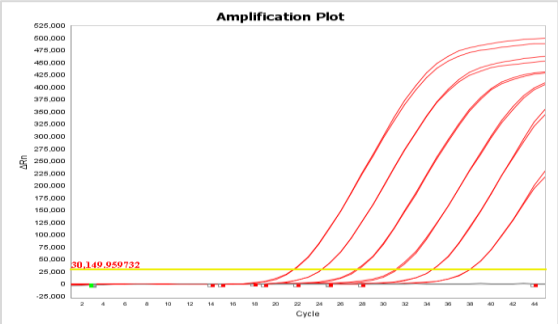
   电泳结果如下图所示：

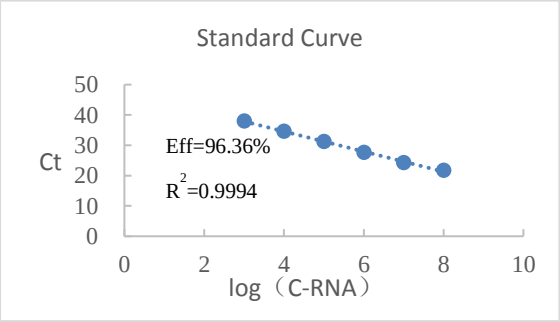


293T RNA-2.6 kb　　293T RNA-4 kb

M：*GL* DNA Marker 5000
1：42℃反转
2：50℃反转
3：55℃反转
4：60℃反转
5：65℃反转

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 96.36%，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。