

Version 4

Code No. AG11707

# *Evo M-MLV* 反转录试剂盒 ( 用于 qPCR )

## *Evo M-MLV* RT Kit 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.



## ➤ 产品概述

本产品是 Real Time RT-PCR 专用的反转录试剂。使用了延伸能力较强的 *Evo M-MLV* (*Moloney Murine Leukemia Virus*) 反转录酶, 可以在短时间内高效合成 cDNA。合成得到的 cDNA 兼容嵌合法和探针法 qPCR, 可根据实验目的, 配合相应的试剂进行高性能的基因分析。

## ➤ 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

## ➤ 产品组成

组分名称	AG11707 (200 rxns / 10 μl)
<i>Evo M-MLV</i> RTase Enzyme Mix <sup>*1</sup>	100 μl
5X RTase Reaction Buffer Mix II <sup>*2</sup>	400 μl
Oligo dT (18T) Primer (50 μM)	100 μl
Random 6 mers Primer (100 μM)	400 μl
RNase free water	1 ml X 2 pcs

\*1: 含有 *Evo M-MLV* RTase, RNase Inhibitor。

\*2: 含有 dNTP。

## ➤ 产品优势

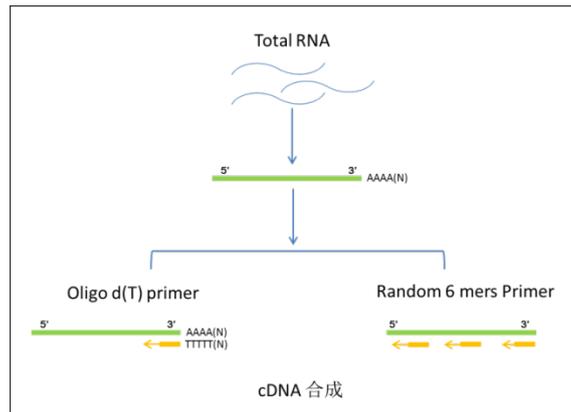
- 1、可快速高效合成 cDNA, 然后进行 qPCR 分析。
- 2、本产品中配有两种引物 Oligo dT (18T) Primer (50 μM) 和 Random 6 mers Primer (100 μM), 可根据实际情况选择不同的引物进行反转录。
- 3、本产品合成所得 cDNA 可兼容 SYBR 法和探针法 qPCR, 可根据实验目的, 选择合适的试剂配合使用, 进行高性能的基因分析。

## ➤ 实验原理

### 1、反转录反应

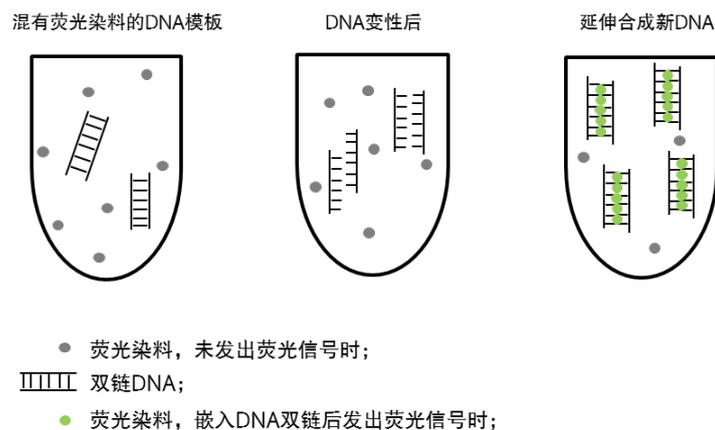
反转录是以 RNA 为模板，通过加入引物和反转录酶合成 cDNA 的过程，其中随机引物 Random primer 适用于长的或具有发卡结构的 RNA 反转录，Oligo dT primer 适用于有 Poly A 尾的 RNA 反转录。已知目的基因时，也可以使用 Specific Primer 作为反转录引物。

对模板 RNA 进行反转录，合成得到 cDNA。



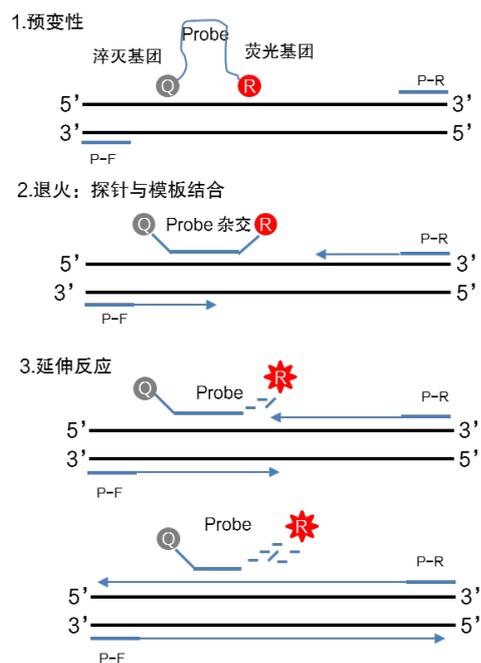
### 2、qPCR 反应原理

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。



探针法也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

- *Evo M-MLV* RTase Enzyme Mix 使用前先离心, 将所有的酶液收集至离心管底部, 减少损失, 并用移液枪轻轻吸打混匀, 过程中尽量避免起泡, 然后再进行使用。
- 需要同时进行数次反应时, 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。
- 选用 SYBR 法和探针法进行实验时需要注意反转录反应中引物的用量与 Total RNA 的用量。
- 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注意防止 RNase 污染, 需要使用灭菌的器具, 操作过程中要避免讲话, 且需要穿戴实验服, 一次性手套等防止 RNA 被污染或降解。
- 样品要注意避免 gDNA 的污染。

## ➤ 实验前准备

1. PCR 仪 (或 37°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)

## ➤ 操作方法

RT-qPCR 实验分为两部分，反转录反应和 qPCR 反应。本产品是针对 qPCR 分析前对 RNA 进行反转录合成 cDNA 的试剂盒。可配合本公司定量相关产品使用。操作如下：

### 1. 按照下表内容进行反应液配制，进行反转录反应。

组分名称	用量
5X RTase Reaction Buffer Mix II	2 $\mu$ l
<i>Evo M-MLV</i> RTase Enzyme Mix	0.5 $\mu$ l
Oligo dT (18T) Primer (50 $\mu$ M) <sup>*1</sup>	0.5 $\mu$ l
Random 6 mers Primer (100 $\mu$ M) <sup>*1</sup>	0.5 $\mu$ l
Total RNA <sup>*3</sup>	-
RNase free water	up to 10 $\mu$ l

反应条件：37  $^{\circ}$ C <sup>\*4</sup> 15 min  
 85  $^{\circ}$ C 5 sec  
 4  $^{\circ}$ C Hold <sup>\*5</sup>

\*1: 如果使用 SYBR Green qPCR 法，Random 6 mers Primer (100  $\mu$ M) 用量为 0.5  $\mu$ l；如果使用探针 qPCR 法，Random 6 mers Primer (100  $\mu$ M) 的用量为 2  $\mu$ l。也可以不使用引物混合物，而选择单独引物，引物使用量如下：

Oligo dT (18T) Primer——25 pmol / 10  $\mu$ l 反应体系

Random 6 mers Primer ——50 pmol / 10  $\mu$ l 反应体系 ( for SYBR Green qPCR 法 )

Random 6 mers Primer ——200 pmol / 10  $\mu$ l 反应体系 ( for 探针 qPCR 法 )

Gene Specific Primer——2.5 pmol / 10  $\mu$ l 反应体系 ( 可在 1~5 pmol 之间进行调整 )

\*2: 配制反转录反应时，为了保证反应液配制的准确性，可将各组分先配制为 Master Mix，再分装到反应管中，最后加入 RNA 样品。反转录反应体系可以根据需要相应调整体积。

\*3: RNA 量可根据需要添加。在 10  $\mu$ l 反转录体系中，使用 SYBR Green qPCR 法时，最多使用 500 ng Total RNA；使用探针法时，最多使用 1  $\mu$ g Total RNA。

\*4: 当使用 Gene Specific Primer 时，可以将反应条件设置为 42  $^{\circ}$ C 15 min；如果为降低非特异性扩增，可将反应温度升高到 50 $^{\circ}$ C。

\*5: 若反应产物立即用于后续 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，如需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 Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit ( Code No. AG11701 ) 为例，具体操作如下：

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

组分名称	20 μl 体系	50 μl 体系
2X SYBR Green <i>Pro Taq</i> HS Premix	10 μl	25 μl
cDNA <sup>*1</sup>	2 μl	5 μl
Primer F (10 μM) <sup>*2</sup>	0.4 μl	1 μl
Primer R (10 μM) <sup>*2</sup>	0.4 μl	1 μl
ROX Reference Dye (4 μM) <sup>*3,4</sup>	0.4 μl	1 μl
RNase free water	Up to 20 μl	Up to 50 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%。

\*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: 请按照不同仪器推荐的反应体系配制反应液。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。

\*4: 若不需要使用 ROX 的 PCR 仪, ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。

#### 两步法 qPCR 扩增程序<sup>\*1</sup>:

	温度	时间	cycles
Step 1	95°C	30 sec <sup>*2</sup>	1
Step 2	95°C	5 sec	40
	60°C	30 sec <sup>*3</sup>	
Step 3	Dissociation stage		

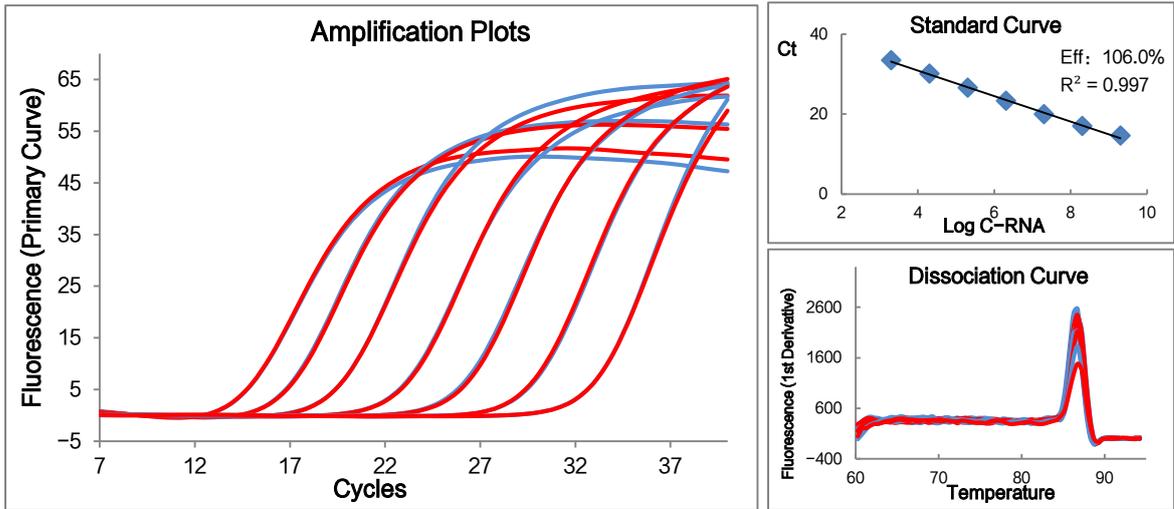
\*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件; 如果引物 T<sub>m</sub> 值较低, 导致两步法扩增效率较差, 可采用三步法进行 PCR 扩增。

\*2: 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 1~2 min。

\*3: 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

- 以不同梯度的小鼠 Total RNA 为模板 (2 μg~2 pg), 用本产品进行反转录, 再以此 cDNA 为模板, 取 2 μl 的 cDNA 原液, 用 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒(Code No.AG11701) 进行 qPCR 检测小鼠 GAPDH 基因。

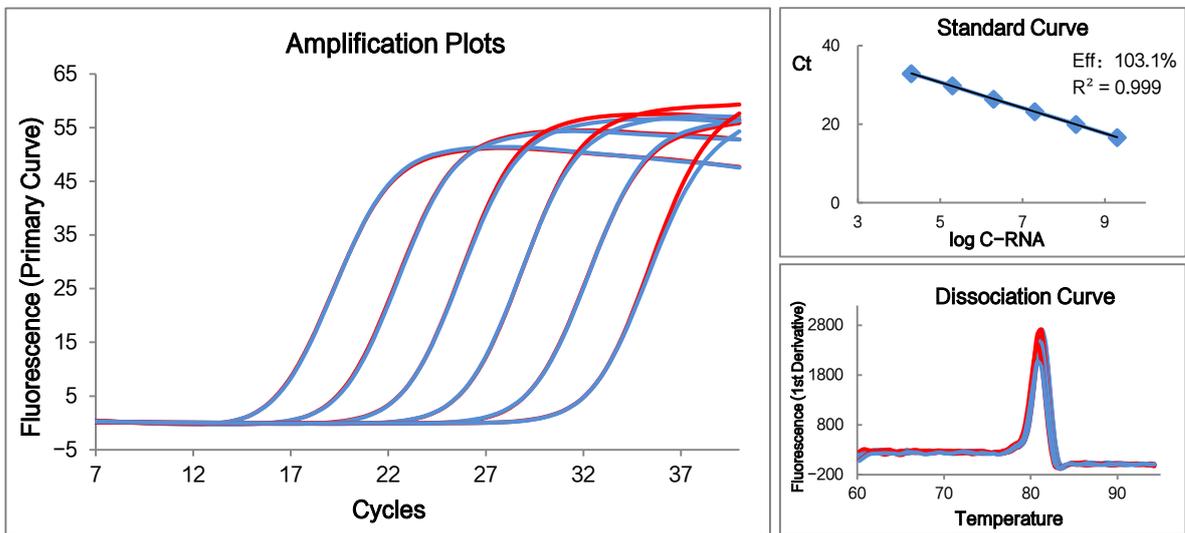


结果如上图：1、标准曲线  $R^2=0.997$ ，扩增效率 106.0%。

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， $2\mu\text{g} \sim 2\text{pg}$  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、无杂峰，扩增特异性强。

2. 以不同梯度的 293T 细胞 Total RNA 为模板 ( $2\mu\text{g} \sim 20\text{pg}$ )，用本产品进行反转录，取  $2\mu\text{l}$  的 cDNA 原液,用 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒(Code No. AG11701) 进行 qPCR 检测 Human *H32F* 基因。



结果如上图：1、标准曲线  $R^2=0.999$ ，扩增效率 103.1%。

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， $2\mu\text{g} \sim 20\text{pg}$  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、无杂峰，扩增特异性强。

## ➤ 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。建议提取 RNA 过程中，严防 RNase 的污染，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. 选用合适的引物

- ❖ Oligo(dT) 引物：适用于含有 Poly(A)且完整性较好的 RNA。不适用于缺少 Poly(A) 尾结构的 RNA，如原核生物 RNA；也不适用于已降解的 RNA，如 FFPE 样品中 RNA；对于含有复杂二级结构的 RNA，可能也不适用 Oligo(dT) 引物。
- ❖ 随机引物：适用于 rRNA, tRNA, 非编码 RNA, microRNA, 降解 RNA, 复杂二级结构的 RNA 等。因为随机引物是由随机碱基组成的寡核苷酸，所以该类引物不具备特异性；随机引物可提高 cDNA 的产量和浓度，但是会使合成的 cDNA 长度变短。
- ❖ 基因特异性引物：适用于已知目的序列。基因特异性引物能够与模板特异性互补，产生目标性很强的 cDNA，对于后续的 PCR 扩增更具特异性。