



M-MLV III Green Two-Step qRT-PCR Kit

产品信息:

组成	MT602-01	规格
M-MLV III (RNase H ⁻) (200U/μl)	10000U	RT 体系/qPCR 体系 20μl×50 次/25μl×240 次
5×RT Mix	500μl×2	
Random Primer(N9)(0.1μg/μl)	60μl	
Anchored Oligo(dT)18 Primer (0.5μg/μl)	60μl	
2×Green qPCR MasterMix	1ml×5	
H ₂ O(RNase free)	5ml	

存储温度: -20℃ 保存。

制品说明:

用M-MLV III和5×RT Mix能更高效地将RNA合成cDNA。PCR使用2×Green qPCR MasterMix。本试剂盒含有从RNA到cDNA，以及qPCR扩增cDNA的全部试剂。2×Green qPCR MasterMix是专用于染料法（SYBR Green I）实时荧光定量PCR的预混体系，包含HotStar Taq DNA Polymerase、PCR Buffer、dNTPs、SYBR Green I荧光染料、Mg²⁺和ROX校正染料，操作简单方便，主要用于基因组DNA靶序列和RNA反转录后cDNA靶序列的检测。

产品特点:

- 1.M-MLV III的RNase H活性缺失，具有更强的延伸能力，灵敏度高，特异性高，热稳定性高，可用于较长的cDNA合成以及高比例的全长cDNA文库的构建；
2. Anchored Oligo(dT)₁₈设计独特能锚定mRNA Poly(A)⁺的5'端区域，退火位点锚定，特异性高，保证cDNA合成效率和成功率；
3. 可用Random Primer (N9) 或基因特异引物 (GSP) 合成第一链cDNA；
4. 合成片段≤8kb；
5. 本产品中使用了全新高效热启动酶HotStar Taq DNA Polymerase与独特的PCR缓冲体系，显著提高PCR的扩增效率，具有高灵敏度和特异性强的特点；
6. 适用于荧光定量 PCR 检测，能够准确地对目的基因进行定量和检测。；
7. 本产品兼容性强，适用于不同厂家、型号的荧光定量 PCR 仪；

操作步骤:

为方便保存和运输本产品所配Random Primer(N9)和Anchored Oligo(dT)18均为干粉，使用前需用60μl RNase free H₂O溶解，具体体积参见产品标签。

第一链cDNA合成。(以20μl反应体系为例)

1. 加入

Components	Volume
Total RNA/mRNA	50 ng-5μg/5-500ng
Anchored Oligo(dT)18(0.5μg /μl)	1μl
or Random Primer(N9)(0.1μg/μl)	1μl
or GSP	2pmol
5× RT Mix	4μl
M-MLV III	1μl
H ₂ O(RNase free) to final volume	20μl

2. 轻轻混匀

如用Anchored Oligo(dT)18或基因特异引物(GSP)，42℃孵育50min。

如用Random Primer, 25℃孵育10min, 42℃孵育50min。

如果扩不出, 可能存在RNA二级结构, 建议提高温度重新扩增。

3. 85℃加热15 min失活M-MLV III。

qRT-PCR

以下举例为常规PCR 反应体系和反应条件, 实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

1. PCR反应体系:

试剂	25μl反应体系	终浓度
2×Green qPCR MasterMix	12.5μl	1×
Forward Primer, 10μM	0.5μl	0.2μM
Reverse Primer, 10μM	0.5μl	0.2μM
Template DNA	1μl	
H ₂ O(RNase free)	Up to 25μl	

注意:

- 通常引物浓度以0.2 μM可以得到较好结果, 可以终浓度0.1-1.0 μM作为设定范围的参考。
- 通常DNA模板的量以10-100 ng基因组DNA或1-10 ng cDNA为参照, 因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同, 可对模板进行梯度稀释, 以确定最佳的模板使用量。
- 推荐反应体系为50 μl, 也可以根据实际实验需求按比例扩大或者缩小反应体系。

2. PCR反应程序:

建议采用下表显示的两步法PCR进行程序设定, 本程序是以ABI7500荧光定量PCR仪为例。

若因T_m值较低的引物等原因, 得不到良好的实验结果时, 可尝试进行三步法PCR扩增, 三步法操作步骤详见《反应条件的优化》。

步骤	温度	时间	
预变性	95℃	10min	} 35-40个循环
变性	95℃	15s	
退火/延伸	60℃	1min	
融解曲线分析			
	95℃	15s	
	60℃	1min	
	95℃	15s	
	60℃	15s	

注意:

- 2×Green qPCR MasterMix所采用的热启动酶须在预变性95℃、10min条件下实现酶的活化。
- 退火温度请以60-64℃作为设定范围的参考, 发生非特异性反应时, 可提高退火温度。
- 本说明是以ABI 7500荧光定量PCR仪为参照设定, 融解曲线分析请以所使用的荧光定量PCR仪推荐的程序进行设定。

反应条件的优化

在荧光定量反应条件优化时, 应从引物浓度、退火温度、延伸时间等方面进行考虑, 以提高反应特异性和扩增效率。

1. 反应特异性和扩增效率高的实验体系应具备以下条件:

- 反应特异性高: 阴性对照无引物二聚体等非特异性扩增; 不产生目的片段以外的扩增。
- 扩增效率高: Ct值低; PCR扩增效率高, 接近理论值100%。

2. 反应条件优化方法:

- 引物浓度: 通常引物浓度以0.2μM可得到较好结果, 可以终浓度0.1-1.0μM作为设定范围的参考。若提高反应特异性, 可降低引物浓度; 若提高扩增效率, 可增加引物的浓度, 由此优化反应体系。
- 退火温度: 建议采用两步法PCR, 退火温度60℃进行反应。若提高反应特异性, 可提高退火温度, 以60-64℃作为设定范围的参

考。

若因使用 T_m 值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法PCR扩增，三步法的退火温度请以 56°C - 64°C 的范围作为设定参考。

- 3) 延伸时间：建议采用两步法PCR，延伸时间1min进行反应。若提高扩增效率，可尝试将延伸时间增加，或尝试三步法PCR。
三步法荧光定量PCR（本程序是以ABI7500荧光定量PCR仪为例）：

步骤	温度	时间	
预变性	95°C	10min	
变性	95°C	10s	} 35-40个循环
退火	$56-64^{\circ}\text{C}$	30s	
延伸	72°C	32s	
融解曲线分析			
	95°C	15s	
	60°C	1min	
	95°C	15s	
	60°C	15s	

注意：

- 1) 本产品所采用的热启动酶须在预变性 95°C 、10min条件下实现酶的活化。
- 2) 无法得到理想的扩增效率时，适当降低退火温度；发生非特异性反应时，提高退火温度，由此优化反应条件。
- 3) 若需提高反应扩增效率，可适当增加延伸时间。
- 4) 本说明是以ABI 7500荧光定量PCR仪为参照设定，融解曲线分 请以所使用的荧光定量PCR仪推荐的程序进行设定。