



# Livning® qPCR RT kit

## 一管化的反转录试剂盒

### 使用说明书

产品名称	单位	货号
Livning® qPCR RT kit	50T	LV-MF012S
Livning® qPCR RT kit	200T	LV--MF012M
Livning® qPCR RT kit	2x200T	LV-MF012 L

#### 【储存条件】

长期保存, 请置于-20°C, 有效期 12 个月。使用后请及时放入-20°C 保存以保证酶的活性。

#### 【产品简介】

本产品是专为两步法 RT-PCR 第一步实验设计的超高灵敏度 RT-PCR 反应系统, 可以从极少量的总 RNA 或 poly(A) mRNA 合成第一链 cDNA, 并能够通读 GC 含量高、二级结构复杂的 RNA 模板。该试剂盒使用 Livning 特制的 Livning M-MuLV Reverse Transcriptase (RTase), 该 RTase 通过多点定点突变去除了 RNase H 的活性 (RNase H-), 并增加了 RTase 酶与模板-引物之间的亲和力, 具有更好的热稳定性, 因此其聚合酶的活性和持续合成能力均高于野生型的 M-MuLV RTase, 合成的 cDNA 产量更高, 长度可达 15 kb。另外, 本产品将引物配比、反转录酶和 RNase 抑制剂优化成 mix 形式, 精简了试剂盒组成, 非常简便操作, 而且对后续 Realtime PCR 反应体系影响也降到最低。

#### 【产品特点】

- 1) 方便快捷: mix 配制, 组分更少, 操作更快; 反转录只需 15min 就可以完成。
- ◆ 超强对后续 qPCR 反应适用性: 通过组分和 Buffer 优化, 使带入到后续 qPCR 反应的逆转录反应液的影响降到最低。
- ◆ 高灵敏度: 对极少量的 RNA 模板也可以进行良好的反转录反应。

#### 【产品组分】

	LV-MF012S-50T	Lv-MF012M-200T
5x Livning® RT Super Mix*	80 µl	400 µl
5x Livning® RT Super Mix Control**	8 µl	40 µl
DEPC-ddH <sub>2</sub> O	0.5 ml	2x1 ml

\* 5x Livning® RT Super Mix: 由 Livning® M-MuLV Reverse Transcriptase, RNase inhibitors, Oligo dT primer, Random Primer, Buffer, dNTPs 等构成的 Mix 形式。打开盖子前, 请先离心, 使液体落在离心管底部后再使用。另外, 本试剂粘度很高, 请小心使用移液器。

\*\*5x Livning® RT Super Mix Control: 该组分是 5x Livning® RT Super Mix 去除了 Livning® M-MuLV Reverse Transcriptase 的 mix, 可以用于反转录的对照。打开盖子前, 请先离心, 使液体落在离心管底部后再使用。另外, 本试剂粘度很高, 请小心使用移液器。

#### 【活性定义】

以 poly(rA) 为模板, oligo(dT) 为引物, 在 42°C 条件下, 10 分钟内催化 1 nmol 的 dTTP 所需要的酶量定义为一个活性单位(U)。

#### 【注意事项】

1. 实验过程中请全程注意避免 RNase 污染。
2. 除酶以外的各种试剂, 使用之前请完全溶解并充分混匀, 以防因盐离子浓度不均影响实验结果。
3. RNA 模板的完整性对 cDNA 合成效率起着决定性作用, 因此请选择可靠的 RNA 提取/纯化方法。建议使用 Livning® Total RNA Extraction Reagent (TRIgent) (货号 lv-MF034) 制备高质量的 RNA 模板, 并设置反转录反应阳性对照。

4. **Livning®** M-MuLV RTase 以 RNA 为模板获得全长的第一链 cDNA，其起始位点由所用引物所决定：
  - 随机引物 (Random Primer) 在 RNA 模板上没有特异性结合位点，所有 RNA 都可以做为第一链 cDNA 合成的模板；
  - Oligo dT Primer 只能以 poly(A) mRNA 作为 cDNA 合成的模板；
  - 采用序列特异性引物 (Gene Specific Primer) 以其结合位点为起始位点。
5. **Livning®** M-MuLV RTase 合成的第一链 cDNA 产物可直接加入 PCR 反应混合物中进行扩增。PCR 扩增使用的耐热 DNA 聚合酶和热循环条件需要根据目的片段的大小、GC 含量、引物特性、以及对保真度的要求等进行选择。
6. 第一链 cDNA 合成产物经过处理后可作为第二链合成的模板，合成含各种标记的 cDNA，作为杂交实验的探针。
7. RNA 可置于 -70°C 以下长期保存，cDNA 合成产物可置于 -20°C 保存。

### 【操作流程】

- 1) RNA 通常具有复杂的二级结构，为了获得更高的合成效率，将 RNA 模板 65°C 孵育 5 分钟，以打开 RNA 的二级结构。
- 2) 然后立即放入冰浴 2min。
- 3) 在冰上加入下列成分（可根据需要，扩大反应体系）：

5x <b>Livning®</b> RT Super Mix	2 $\mu$ l
RNA 模板	0.01~1 $\mu$ g
DEPC-ddH <sub>2</sub> O	补足至 10 $\mu$ l

进行反转录阴性对照时，可用 5x **Livning®** RT Super Mix Control 代替 5x **Livning®** RT Super Mix，可以确认信号是否来自 cDNA。

- 4) 轻轻混匀，短暂离心；37°C 孵育，15min；50°C 孵育，5min（可选）。
- 5) 96°C 加热 5 分钟使酶失活；
- 6) 置于冰上进行后续实验或冷冻保存。

### 【补充说明】

以下流程为选做步骤，请根据实验情况酌情选择。

1. RNase-free DNase I 处理 RNA 模板的方法：

- 1) 在 DNase, RNase-free 离心管中加入下列试剂：

RNA 样品	2-5 $\mu$ g
10× DNase I Buffer	1 $\mu$ l
DNase I (2 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
RNase Inhibitor	0.25 $\mu$ l
DEPC-ddH <sub>2</sub> O 补足至	10 $\mu$ l

- 2) 混匀，短暂离心，37°C 放置 30 分钟；
- 3) 加入 1  $\mu$ l 50 mM EDTA，65°C 放置 15 分钟使 DNase I 失活；或者直接使用酚/氯仿抽提去除 DNase I；
- 4) 为避免干扰反转录体系，RNA 加入量最好不超过反转录体系的 1/5，如果 RNA 浓度过低，建议沉淀浓缩后使用。

2. 去除第一链 cDNA 合成产物中的 RNA 方法：

- 1) 加入 0.5 $\mu$ l RNase H，混匀，30°C 反应 20 分钟，70°C 放置 20 分钟；
- 2) 取 5  $\mu$ l RNase H 处理的 cDNA，加入 95  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O（即稀释 20 倍）；
- 3) 取 2  $\mu$ l 稀释后的 cDNA 作为模板用于 PCR 扩增。