



12-03

**ReverTra Ace qPCR RT
Master Mix**
(Code No. FSQ-201)

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

目 录

【1】 简介.....	1
【2】 产品介绍	2
【3】 其他必需品.....	3
【4】 使用方法	4
【5】 APPENDIX.....	5
【6】 常见问题	7
【7】 相关产品	8

【 注意 】

本试剂盒中所含的试剂均为科研用试剂。**请勿作为诊断、临床试剂用**。此外，对于本产品的有害性调查还不十分全面，因此，在使用时，请严格遵守实验室的一般注意事项，适当使用保护用品，安全操作。

【 保存 】

所有组分请均保存于**-20℃**条件下。**长期不用时，请在-30℃条件下保存。**

【1】 简介

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix 是利用本公司高效率逆转录酶「ReverTra Ace」开发的 Realtime PCR 用逆转录反应试剂盒。

本产品是包含逆转录反应所需要的所有成分（ReverTra Ace、RNase Inhibitor、Oligo dT Primer、Random Primer、dNTPs、反应 buffer）的 5x 浓度完全预混型试剂，只需添加模板 RNA 和水即可迅速地开始反应。而且，由于采用了最适合于 Realtime PCR 用短链目的片段 cDNA 合成的反应组成，可在短时间内高效地配制适用于 Realtime PCR 的 cDNA 模板。

本产品不含 Realtime PCR 试剂，进行 Realtime PCR 实验时，推荐我司高性能 Realtime PCR 试剂 THUNDERBIRD qPCR Mix 或 Realtime PCR Master Mix 系列（请参考[7]相关产品）。

◆本产品特征◆

1. 完全预混型试剂

本产品是在-20℃条件下也不会冻结的完全预混型试剂，只需添加模板 RNA 和水即可简便地合成重现性良好的 cDNA。另外，由于还添附了预混型 no-RT Control，可非常简便地配制逆转录反应（-）的对照反应液。

2. 可对 RNA 的整个区域进行均一的逆转录反应

采用了按最佳比例混合的 Primer mix（Oligo dT 及 Random Primer），可对 RNA 的整个区域进行均一、高效率的逆转录反应。

3. 短时间·简便的实验流程

由于采用了最适用于 Realtime PCR 用的 cDNA 合成的反应 buffer，只需 15 分钟即可完成高效率的逆转录反应。此外，在 Realtime PCR 的过程中，会自动清除抑制反应的残留 RNA，无须另外进行 RNase H 处理。

4. 与 Realtime PCR 试剂的高适应性

采用了对 Realtime PCR 的反应体系影响最小的组分，即便向 PCR 反应液中带入最多 20% 液量的逆转录反应液，也能显示出很好的线性。最适用于低表达量 mRNA 的高灵敏度检测。

【2】 产品介绍

本产品包含以下试剂，10 μ l 反应体系可用 200 次。同时还添附有 10 μ l 反应体系可用 20 次的 **5x RT Master Mix no-RT Control**。所有组分请均保存在-20 $^{\circ}$ C 条件下^(注1)。

试剂名	保存条件 ^(注1)	容量
5x RT Master Mix ^(注2)	-20 $^{\circ}$ C	400 μ l
5x RT Master Mix no-RT Control ^(注2)	-20 $^{\circ}$ C	40 μ l
Nuclease-free Water	-20 $^{\circ}$ C	1000 μ l x2

5x RT Master Mix

该组分是高效率逆转录酶 ReverTra Ace、RNase inhibitor、Oligo dT Primer、Random Primer、反应 buffer、MgCl₂、dNTPs、甘油等的 5x 浓度的预混液。打开盖子前，请先 spin down，使液体落到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 RT Master Mix no-RT Control

该组分是从 5x RT Master Mix II 中去除了 ReverTra Ace 后的 Master mix，可用于配制逆转录（-）的对照溶液。此外，与 **5x RT Master Mix** 一样，打开盖子前，请先 spin down，使液体落到离心管底部后再使用。同时，本试剂粘度很高，请小心使用移液器。

Nuclease-free Water

该组分是 Nuclease-free 级别的灭菌蒸馏水。为防止影响聚合酶的活性，未进行 DEPC 处理。

注 1) 长期不用时，请在-30 $^{\circ}$ C 条件下保存。

注 2) 本试剂盒中添附的 5x RT Master Mix 及 5x RT Master Mix no-RT Control 与本公司带基因组 DNA 去除功能的试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No.FSQ-301)中所含的相应组分组成不同，**不能混用**。请务必使用本试剂盒中添附的 5x RT Master Mix 及 5x RT Master Mix no-RT Control。

注 3) 本产品是含有逆转录引物（Random Primer 及 Oligo dT Primer）的预混试剂，不能使用基因特异性引物(Gene Specific Primer)。使用基因特异性引物时，请使用 ReverTra Ace qPCR RT Kit (Code No.FSQ-101)。

【3】 其他必需品

除本产品之外，请再准备以下几种试剂和仪器。

• Thermal cycler和Incubator

本产品的建议使用温度为37°C、50°C、65°C以及98°C，请准备好符合条件的相关仪器。

• Nuclease-free Water

本产品已添附可使用200次的Nuclease-free Water，此外请再准备一些Nuclease-free Water，以便在稀释模板RNA时使用。推荐使用未经过DEPC处理的Nuclease-free Water。也可以使用经DEPC处理过的水，但残留的DEPC会抑制反应的进行，因此请使用高压灭菌器彻底清除DEPC之后再使用。此外，为防止核酸的混入，用于逆转录反应和PCR反应的Nuclease-free Water，建议和用于其它实验的Nuclease-free Water分开保存，避免共用。

• Total RNA

使用本产品，可以把Total RNA直接作为模板使用。从组织、培养细胞等得到Total RNA中，作为表达分析对象的mRNA的含量通常为1-2%。除了进行检测表达量极低的目的基因之外，通常情况下都可以明显地检测到作为模板的Total RNA。

用过柱纯化型RNA抽提试剂盒或AGPC(Acid Guanidium - Phenol - Chloroform)法纯化的Total RNA中往往会混入基因组DNA。当检测目的基因中存在假基因，或无法在横跨内含子的位置上设计引物时，经常会检测到来自混入的基因组DNA的假阳性信号，影响定量的准确性。此时，可根据实际需要，使用DNase I等去除基因组DNA，或使用本公司带有去除基因组DNA功能的产品ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Code No. FSQ-301)。

• poly(A)⁺ RNA (mRNA)

利用poly(A)⁺ RNA和Oligo(dT)杂交后，选择性地分离出仅有poly(A)⁺末端的mRNA。在提纯过程中浓缩mRNA，是为了在高灵敏度下能够检测mRNA。但是，与Total RNA相比mRNA更容易受到RNase的分解，也不能以ribosomal RNA为内参来进行相对定量。

【4】 使用方法

(1) RNA的变性(option)*

把RNA在65°C条件下热变性5分钟后，立即置于冰上冷却。

*在经过以上步骤的处理后，对于容易形成高级结构的RNA可以提高逆转录的效率，初次实验时，建议探讨条件。（进行以上步骤处理时，请不要添加5x RT Master Mix。）

(2) 反应液的配制

请在冰上配制如下反应液。

5x RT Master Mix	2 μ l
RNA template	1pg~1 μ g
Nuclease-free Water	
<hr/>	
Total	10 μ l

- 进行逆转录（-）对照时，可用5x RT Master Mix no-RT Control代替5x RT Master Mix。通过逆转录（-）的对照，可确认信号是否来自cDNA。
- 可根据需要，扩大反应体系。

(3) 逆转录反应

将反应液轻轻地搅拌均匀后，按以下温度进行反应。

37°C, 15min.	} (逆转录反应)
50°C, 5min. (option)**	
98°C, 5min.	} (酶失活反应)
4°C, hold	

** ReverTra Ace经改良后提高了高温反应性，应用在本试剂盒中，提高了逆转录效率。

反应结束后，请在4°C或-20°C条件下保存。Realtime PCR时，作为模板直接或稀释后添加。

- 添加到PCR反应液中的逆转录反应液，最多请不要超过20%。过量的添加会导致PCR反应效率低下，无法准确地定量。

【5】 Appendix

A. 实验例

<方法>

cDNA合成

试剂:本试剂盒ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Code No.FSQ-201)

模板:HeLa total RNA 2pg-2 μ g /20 μ l反应体系

Realtime PCR

试剂:THUNDERBIRD SYBR[®] qPCR Mix (Code No.QPS-201)

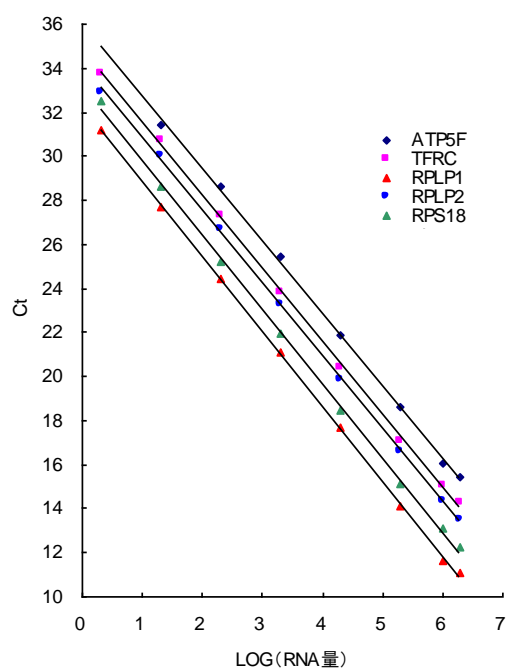
模板:上述cDNA2 μ l/20 μ l反应体系(带入量10%)

目的片段:以House Keeping Gene为代表的5种基因

测定用仪器:Applied Biosystems 7900HT

<结果>

Template RNA量(pg)	Log(RNA量)	qPCR时各Target的Ct值				
		ATP5F	TFRC	RPLP1	RPLP2	RPS18
2	0.301		33.76	31.16	32.89	32.54
20	1.301	31.43	30.73	27.70	30.05	28.65
200	2.301	28.64	27.29	24.44	26.72	25.22
2,000	3.301	25.41	23.79	21.12	23.31	21.98
20,000	4.301	21.86	20.43	17.69	19.88	18.42
200,000	5.301	18.65	17.09	14.14	16.59	15.10
1,000,000	6.000	16.03	15.03	11.63	14.37	13.09
2,000,000	6.301	15.42	14.28	11.11	13.53	12.28
/20 μ l	Slope	-3.280	-3.303	-3.384	-3.284	-3.368
	R2	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999
	Eff.	101.8%	100.8%	97.5%	101.6%	98.1%



结果可见, 5种目的基因的标准曲线没有交叉, 显示了很好的直线性。由此可知, 用本试剂盒可对各种浓度范围的RNA进行同等效率的逆转录。

B. 相关Protocol(Total RNA的DNase I处理)

在通过AGPC法等提纯的Total RNA内混有基因组DNA，可能会发生由基因组DNA产生假阳性信号的情况(请参考p3)，请根据以下的方法清除基因组DNA<或使用本公司去除基因组DNA专用试剂盒ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover>。

(1) 反应液的配制和反应

反应液组成 (例)

Total RNA(<10µg)	X µl
10x DNase I Buffer (10mM Tris-Cl, pH7.6, 2.5mM MgCl ₂ , 0.5mM CaCl ₂)	1 µl
RNase-free DNase I (10U/µl)	0.5 µl
Nuclease-free Water	to 10 µl

配制好以上的反应混合液后，置于冰上反应10—30分钟。

(2) 纯化 (可使用一般市售的纯化试剂盒)

在反应液内添加100µl的Nuclease-free Water、100µl的TE饱和苯酚，用vortex使其充分混合后，置于冰上5分钟

↓

12,000rpm、5分钟的离心后，回收上清液。

↓

添加100µl的氯仿后使其混合。

↓

12,000rpm、5分钟的离心后，回收上清液。

↓

添加100µl的5M醋酸铵、200µl的异丙醇，使其混合后置于-20°C条件下30分钟。

↓

12,000rpm、5分钟的离心后，弃上清液。

↓

在沉淀中加入70%乙醇。

↓

12,000rpm、5分钟的离心后，弃上清液。

↓

在沉淀中加入适量的Nuclease-free Water，使其溶解。

【6】 常见问题

现象	原因	对策
Realtime PCR时检测无信号, 或者信号出现延迟	RNA的纯度较低	可能是由于配制RNA时残留的杂质抑制了逆转录反应。请重新提纯模板RNA。
	RNA被降解	RNA可能是被混入的RNase降解。请重新配制RNA。此外, 低浓度的RNA保存时, 除更容易被RNase降解外, 由于被反应容器吸附, 实际的RNA的量会有所减少。建议避免把使用过的低浓度RNA冻结保存后再使用, 最好每次使用时直接从高浓度的保存液稀释。
	RNA的量过多或过少	经确认, 使用本产品时, 添加1pg~1μg范围的RNA量(10μl反应体系)都能够进行稳定有效的逆转录反应。但是由于RNA的种类和品质等的不同, 可以进行反应的RNA的量可能会有所改变。请适当增减模板RNA的添加量。
	RNA容易形成高级结构	RNA容易形成高级结构的情况下, 会抑制逆转录反应。建议在逆转录反应前, 将RNA在65°C条件下热变性5分钟, 急速在冰上冷却后再使用。或在37°C·15分钟逆转录反应后, 再追加50°C·5分钟的反应。
	反应温度不当	改变反应条件会对引物的退火效率、酶的活性、逆转录后的酶失活、模板RNA的清除效率等多方面产生影响。在进行实验时, 请务必按照本使用说明书上推荐的条件来设定反应温度。
	逆转录反应液的添加量过多	经确认, 使用本产品时, 即使在PCR反应液内添加最多20%的逆转录反应液也能表现出良好的反应曲线。但是使用不同的PCR试剂, 可能会使表达量降低。请减少逆转录反应液的添加量。
用no-RT Control的反应液进行Realtime PCR时可确认到扩增	RNA中混入了过量的基因组DNA	可能是由于模板RNA中混入的基因组DNA引起的, 请重新设计引物, 或者进行DNase I处理, 再次纯化模板RNA后再进行逆转录反应。
	产生了引物二聚体	融解曲线分析时, no-template control在目的片段的低温侧出现峰值, 疑似有引物二聚体产生。除引物序列外, 引物二聚体因引物质量不好而产生。此时应先再次摸索PCR反应条件, 如果仍无法改善, 则可进行引物再设计或再合成。再次合成时, 纯化级别应在HPLC以上。

【7】 相关产品

Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂

品名	容量	Code No.
Realtime PCR用cDNA合成试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Kit	200次份	FSQ-101
去除基因组DNA Realtime PCR用cDNA合成Master Mix ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	200次份	FSQ-301

Realtime PCR 试剂

品名	容量	Code No.
Realtime PCR用Master Mix(Probe Assay用) Realtime PCR Master Mix	1ml x 5	QPK-101
Realtime PCR用Master Mix(SYBR [®] Green Assay用) SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix	1ml x 5	QPK-201
Realtime PCR用Master Mix(SYBR [®] Green Assay用) SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix -plus-	1ml x 5	QPK-212
各种荧光Probe·荧光Primer检测体系用 Realtime PCR试剂 THUNDERBIRD Probe qPCR Mix	1ml x 1 1.67ml x 3	QPS-101T QPS-101
SYBR [®] Green I检测体系用Realtime PCR试剂 THUNDERBIRD SYBR[®] qPCR Mix	1ml x 1 1.67ml x 3	QPS-201T QPS-201

※THUNDERBIRD qPCR Mix 中, 50X ROX reference dye 另外单独添附。

One-step PCR 试剂

品名	容量	Code No.
One-step Realtime PCR用Master Mix (Probe Assay用) RNA-direct Realtime PCR Master Mix	0.5ml x 5	QRT-101
One-step Realtime PCR用Master Mix (SYBR Green Assay用) RNA-direct SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix	0.5ml x 5	QRT-201

※RNA-direct 系列中, 50mM Mn(OAc)₂ 另外单独添附。

◆详情请浏览本公司中文网页
<http://www.bio-toyobo.cn>

[制造 · 销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

上海市浦东新区张杨路 **188** 号汤臣商务中心 **C** 座 **310** 室

邮编：**200122**

交货期限 · 订货相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:sales@bio-toyobo.cn

产品内容 · 技术相关咨询

Tel:021-5879 4142 Fax:021-5879 5259

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

代理商资料：