

高效率逆转录试剂盒

First Strand cDNA Synthesis Kit

ReverTra Ace – α –

(Code No. FSK-101F)

使用说明书

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

目 录

【1】 简介.....	1
【2】 RT-PCR 法的原理	2
【3】 试剂盒的组成	3
【4】 操作步骤	3
【5】 添付引物的说明.....	5
【6】 处理 RNA 过程中的注意事项	6
【7】 进行 RT-PCR 过程中的注意事项.....	6
【8】 参考文献	6
【9】 常见问题	7
【10】 相关产品	9

【 注意 】

本产品为科研用试剂。请勿作为诊断、临床试剂使用。此外，对于本产品的有害性调查还不十分全面，因此，在使用过程中，请严格遵守实验室作业的一般注意事项，适当使用保护用品，安全操作。

组分中的5×RT Buffer在溶解时，可能会出现白色沉淀现象，但不影响其品质。此时，请使用振荡器等仪器使其混合均匀，等完全溶解后再使用。

【 保存 】

- 各组分请保存于-20℃条件下。
- 为了保证实验效果，请在收到产品的一年之内使用完毕。

【1】 简介

将逆转录 (Reverse Transcription; RT)反应和 PCR (Polymerase Chain Reaction) 反应组合在一起的 RT-PCR法,是能够比较简便和迅速地检测来自多个样品的RNA的检测方法。所以,近年来作为一般的方法被广泛应用于mRNA表达有无、表达量、长度的异常等RNA的分析和cDNA克隆中。

本公司利用基因工程学的方法改变了来自 MMLV (Molony murine leukemia virus) 的逆转录酶,使阻碍合成长链 cDNA 的 RNase H失活,成功开发了大幅度提高 cDNA合成能力的改良型酶ReverTra Ace 。

ReverTra Ace - α -(Code No.FSK-101F)是以ReverTra Ace为核心酶的First strand cDNA合成试剂盒。由于本试剂盒包含了RT用引物及Positive Control,所以能够简单地进行逆转录反应。也可以应用于手头上各种DNA聚合酶的PCR反应模板的制备。例如,通过和High fidelity PCR用酶, Long PCR用酶等的结合,能够进行目的性更强的RT-PCR。

◆ 本产品特征 ◆

1. 高cDNA合成能力

本产品中使用的ReverTra Ace是大幅度提高cDNA合成能力的改良型酶,已确认能够合成14kb以上的cDNA 。

2. 高检测灵敏度

由于对ReverTra Ace - α -进行了最优化处理,即便带入全量的逆转录反应液也不会对PCR反应造成阻碍,所以可以使用各种DNA聚合酶,在同一个离心管中进行RT反应和PCR反应。

【2】 RT-PCR 法的原理

RT-PCR法，如图1所示：由从模板RNA开始合成First Strand cDNA的逆转录反应步骤，和以此cDNA为模板合成Second Strand cDNA，并对目的遗传基因片段进行扩增的PCR步骤组成。

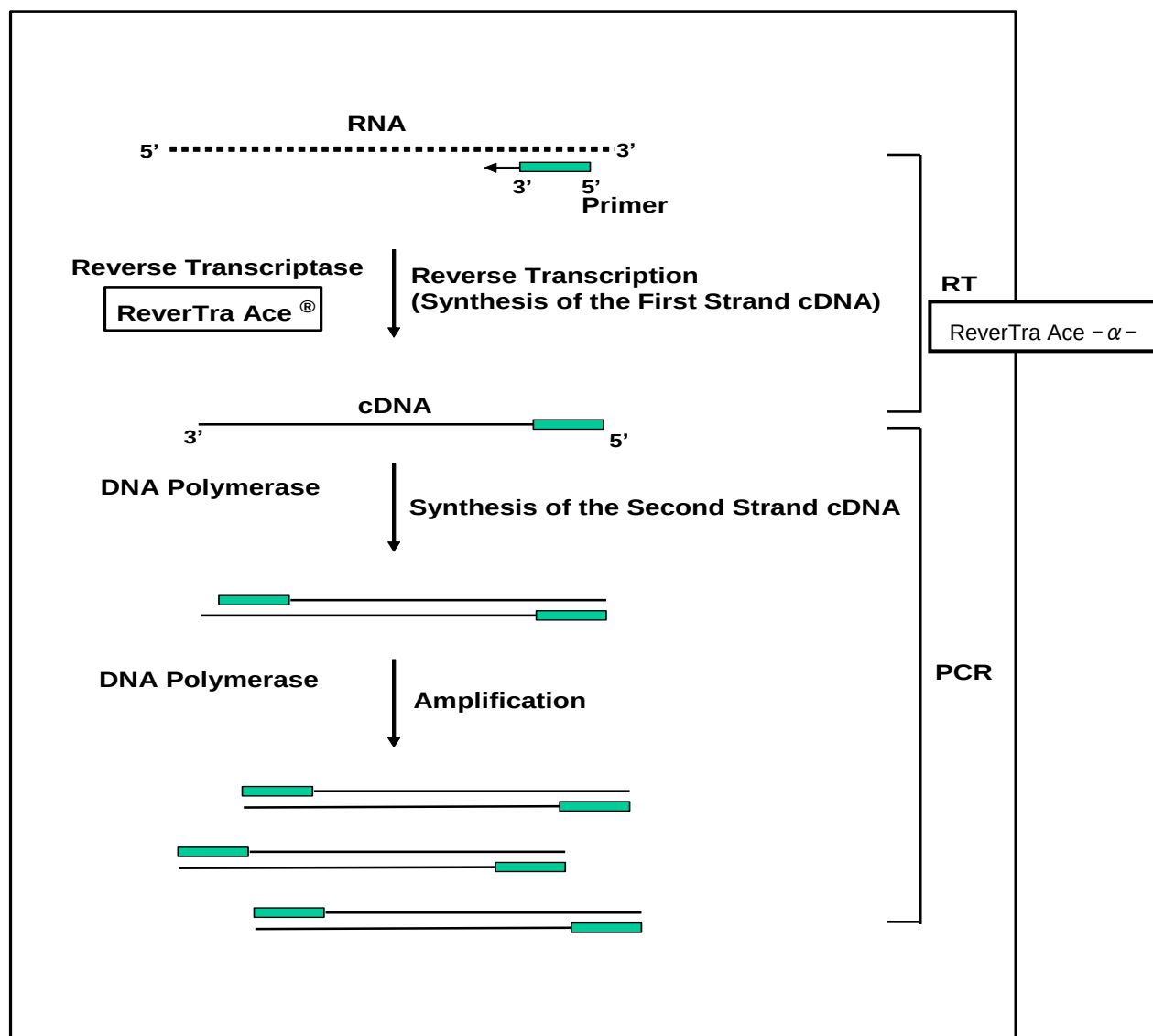


图1. RT-PCR法的原理

【3】 试剂盒的组成

No	组成成分	FSK-101F 100 次份
1	ReverTra Ace	100 μ l
2	RNase Inhibitor (10U/ μ l)	100 μ l
3	5 $\times$ RT Buffer (含有 25mM MgCl ₂)	400 μ l
4	dNTP Mixture (各 10mM)	200 μ l
5	RNase Free H ₂ O	1200 μ l
6	Oligo(dT) ₂₀ (10pmol/ μ l)	100 μ l
7	Random Primer (25pmol/ μ l)	100 μ l

※ 所有组分请保存于-20℃条件下。

※ 组分中的 5 $\times$ RT Buffer 在溶解时，可能会出现白色沉淀现象，但不影响其品质。此时，请使用振荡器等仪器使其混合均匀，等完全溶解后再使用。

[添付的引物]

Oligo(dT)₂₀ 5'-(dT)₂₀-3'

Random Primer 5'-(dN)₉-3'

【4】 操作步骤

1. RNA的热变性 (热变性步骤可消除RNA大多数二级结构，从而使引物可以结合。因此，对于容易形成高级结构的RNA可以提高逆转录的效率。)

RNase Free H₂O (11-X) μ l

Primer (任选以下一个种类)

•Random Primer *	(25 pmol/ μ l)	1 μ l
•Oligo (dT) ₂₀	(10 pmol/ μ l)	1 μ l
•序列特异性下游引物**	(10 pmol/ μ l)	1 μ l

RNA (任选以下一个种类Y μ l)

•Total RNA	(1 μ g 以下)
•mRNA	(10~100 ng)

12 μ l

65℃, 5min.后，立即置于冰上。

2. 反应液配置

试剂	使用量
第 1 步变性后的 RNA 溶液	12 μ l
5 $\times$ RT Buffer	4 μ l
dNTP Mixture (各 10 mM)	2 μ l
RNase Inhibitor (10 U/ μ l)	1 μ l
ReverTra Ace ***	1 μ l ***
Total Volume	20 μl

3. 逆转录反应

- ↓ (30°C、10 min.) *
- ↓ 42°C、20 min. ****
- ↓ 99°C、5 min. *****
- ↓ 4°C、5 min.
- ↓ 瞬间离心

* 【注】使用Random Primer 时，为了能够充分退火，请在30°C条件下，进行10分钟的培养。

*** 请注意：请务必使用本试剂盒添附的ReverTra Ace，使用量 1 μ l/反应。如果添加过量，则不能充分进行热处理，从而会阻碍PCR反应。

**** 片段较长时，可适当延长此步骤时间（20-60min）。

***** 由于逆转录酶在反应后和cDNA结合，所以请在99°C下进行5分钟的热处理。

4. PCR

基本上遵从普通DNA聚合酶的使用方法。以下介绍一般的使用例。

试剂	使用量
(3. 逆转录反应的) 产物	20 μ l
灭菌蒸馏水	67 μ l
10 $\times$ PCR Buffer*	10 μ l
序列特异性上游引物(10 pmol/ μ l)	1 μ l
序列特异性下游引物** (10 pmol/ μ l)	1 μ l
DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ l)	1 μ l
Total Volume	100 μl

↓ PCR（目的片段长度为1 kb左右）

94°C	30 sec.	(30循环)
60°C	30 sec.	
72°C	1 min.***	

↓

取一部分样品，进行琼脂糖凝胶电泳，确认目的扩增片段的生成。

【注】

- * 若购入的是 Mg^{2+} 另外添付的产品，请添加 Mg^{2+} 。
- ** 已将序列特异的下游引物用于逆转录反应步骤的情况下，请以1 μ l 灭菌蒸馏水代替本步骤中的该引物。
- *** 根据使用的酶的不同调整延伸时间。使用Taq聚合酶时，如果目的片段长度超过1 kb，请以1min./kb为基准延长延伸时间。

【5】 添付引物的说明

请遵照以下标准，选择逆转录反应的引物。

1、序列特异性下游引物（Control Primer R）

一般情况下，当使用具有和模板 RNA 有互补性序列的引物时，有必要事先了解目的片段的序列。

2、Oligo（dT）₂₀

只限于在具有 Poly（A）tail 的 mRNA 逆转录反应中使用。请不要在原核生物的 RNA 以及真核生物的 rRNA、tRNA 中使用。

3、Random Primer

无论 Poly（A）tail 的有无，一般情况下都可以使用。通过 Random Primer 进行逆转录反应时，能够利用任何成对的序列特异的引物进行 PCR 反应。通过 Random Primer 进行逆转录反应时，为了让引物充分退火，请在 30°C 环境中温育 10 分钟。

【6】 处理 RNA 过程中的注意事项

1.抑制 RNase 的混入

在 RT-PCR 法中，抑制 RNase 的作用是非常重要的。因此，在防止从使用的器具和试剂中混入 RNase 的同时，得到纯度较高的 RNA 也非常重要。在注意实验环境的同时，为防止从唾液和汗水带入 RNase，建议使用口罩、手套等防护用品。

2.关于器具类

实验器具应尽可能将一次性塑料制品进行高温高压湿热灭菌后再使用。使用玻璃器具时，应进行干热灭菌，或者在 0.1% Diethylpyrocarbonate (DEPC)溶液中 37℃条件下浸泡 12 小时，再进行高温高压湿热灭菌（121℃•30 分钟）后使用。

【7】 进行 RT-PCR 过程中的注意事项

本产品按可利用 Total RNA、tRNA、mRNA、rRNA 作为模板的思路设计。但为确保无论在何种条件下都能得到高效的扩增产物，建议使用纯度较高的 RNA 样品。

使用本公司的核酸抽提试剂盒 MagExtractor -RNA- (Code No.:NPK-201F) 和磁珠分离专用台架 *Magical Trapper*(Code No.:MGS-101)能够在短时间内简便地配制高纯度的 Total RNA。

【8】 参考文献

1. Takagi, M., Nishioka, M., Kakiyama, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4504-4510 (1997)

【9】 常见问题

1. 不能确认扩增条带，且扩增效率较差。

可能原因		对策
模板 RNA	• 纯度不够	• 重新配制
	• 模板量不够	• 增加模板量 • 增加 PCR 的循环次数
	• 失活	• 重新配制 • 使用频率较高时，事先进行少量多管分装
	• 有高级结构	• 在 RT 中使用 Random Primer • 将含有除酶以外试剂的 RT 反应液在 65°C 条件下加热 5min.后冰浴 5min., 再进行 RT 反应
引物	• Tm 值过低	• 降低退火温度或重新设计引物
	• 序列不合适	• 以不具有 Poly(A) tail 的 RNA 为模板时，不能使用 Oligo(dT) ₂₀ • 确认序列是否正确 • 确认引物内或引物之间有无互补的领域 • 确认 PCR 引物对是否没有结合在同一条带上
	• 引物量太少	• 使用与 RT primer 适合的量 • 每一反应使用 10pmole 以上
PCR 条件	• Mg ²⁺ 浓度低	• 提高 Mg ²⁺ 浓度 (如: 2mM)
	• 退火温度过高	• 探讨 PCR 条件 (如: 降低退火温度 2~5°C)
	• 延伸时间短	• 探讨 PCR 条件 (如: 将延伸时间设置为 1min./kb)
	• 热循环仪工作不正常	• 确认热循环仪工作是否正常
其它	• RNase 的污染	• 通过 Control RNA 进行确认 • 重新配制模板 RNA • 模板 RNA 变性时添加预先准备的 RNase Inhibitor • 使用新的试剂
	• 逆转录酶的量太多	• 每次反应，使用 1 μl 添附的 ReverTra Ace
	• 酶失活	• 通过 Control RNA 进行确认 • 使用新的试剂

2. 非特异性条带较多

可能原因		对策
模板 RNA	• 模板量过多	• 减少模板量
	• 基因组 DNA 的污染	• 将没有进行逆转录反应的 Negative Control RNA 同时进行 PCR • 进行 DNase I 处理
引物	• 目的片段以外含有其他可使引物较容易退火的领域	• 重新设计引物
	• 序列不合适	• 重新设计引物
	• 引物量不合适	• 探讨引物用量
PCR 条件	• Mg^{2+} 浓度过高	• 降低 Mg^{2+} 浓度 (如: 1mM)
	• 退火温度过低	• 提高退火温度 (2~5°C) • 探讨 2 步法、step down PCR
其它	• 样品间的交叉污染	• 经常更换 TIP 头 • 使用过滤 TIP 头 • 区分配制 RT-PCR 反应液的器具和进行电泳的器具 • 区分配制 RT-PCR 反应液的配制场所和电泳场所

【10】 相关产品

●试剂盒组分单卖品

品名	包装	保存	Code No.
ReverTra Ace <高效率逆转录试剂>	10,000 U	-20℃	TRT-101
RNase Inhibitor (Recombinant type)	2,500 U	-20℃	SIN-201
10 mM dNTPs	各 2 μ moles /0.2ml	-20℃	NTP-301
Oligo(dT) ₂₀	1 nmole	-20℃	FSK-201
Random Primer (9mer)	2.5 nmoles	-20℃	FSK-301

●RNA 抽提相关试剂及仪器

Magical Trapper <磁珠分离用台架>	1 个	室温	MGS-101
---------------------------	-----	----	---------

●其他 RT-PCR 试剂盒

RT-PCR Quick Master Mix <使用 Tth DNA Pol. 的 1-step RT-PCR Kit>	50 次份	-20℃	PCR-311
--	-------	------	---------

●Realtime PCR 相关试剂

ReverTra Ace qPCR RT Kit <Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒>	200 次份	-20℃	FSQ-101
THUNDERBIRD® Next SYBR qPCR Mix <高效率 Realtime PCR Master Mix>	1.67mL×3 支	-20℃	QPX-201
Realtime PCR Master Mix <Realtime PCR 用 Master Mix (Probe 检测用)>	1ml×5 支	-20℃	QPK-101
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix <Realtime PCR 用 Master Mix (SYBR® Green I 检测用)>	1ml×5 支	-20℃	QPK-201
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -plus- < Realtime PCR 用 Master Mix (SYBR® Green I 检测用)>	1ml×5 支	-20℃	QPK-212
THUNDERBIRD Probe qPCR Mix <各种荧光 Probe・荧光 Primer 检测用 Realtime PCR 试剂>	1.67ml×3 支	-20℃	QPS-101
THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix < SYBR® Green I 检测用 Realtime PCR 试剂>	1.67ml×3 支	-20℃	QPS-201

[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 500 号华润时代广场 28 层 AL 座

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>