



12-03



ReverTra Ace qPCR RT Kit

(Code No.FSQ-101)

中文说明书

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department

OSAKA JAPAN

目录

[1] 前言	1
[2] 产品内容	2
[3] 其他必需品	3
[4] 使用方法	4
[5] 相关操作步骤	5
[6] 常见问题	8
[7] 相关产品	9

【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。在使用时，请严格遵守实验室的一般注意事项，适当使用防护用品，安全操作。

【保存】

所有组分请均保存于 -20℃ 条件下。

[1] 前言

ReverTra Ace qPCR RT Kit 是基于制作 Realtime PCR 用模板 cDNA 的目的而开发的高效率且使用简单方便的逆转录反应试剂盒。本产品采用了本公司高性能逆转录酶 ReverTra Ace 和作为 Realtime PCR 目的片段短链 cDNA 合成的最优化反应成分，能够高效率地合成适用于 Realtime PCR 的 cDNA 模板。此外，本产品简化了试剂盒的构成并且拥有快速的反应操作的特点，能够在短时间内简单方便地进行 cDNA 合成。

※ 本产品的试剂盒内没有添附 Realtime PCR 试剂。关于 Realtime PCR 产品，推荐使用本公司的 Realtime PCR 用试剂 Realtime PCR Master Mix 系列。（详情请参考 [7] 相关产品的内容）。

◆ 本产品特征 ◆

1. 对应各种不同长度目标片段的高效率逆转录

ReverTra Ace qPCR RT Kit 采用了最适合于 Realtime PCR 用 cDNA 合成的反应缓冲液，和以最恰当比例混合的 Primer 混合液，对于各种不同长度的目标片段，不用摸索条件就能够进行高效率的逆转录反应。

2. 反应时间短、操作简单方便

ReverTra Ace qPCR RT Kit 只需要 15 分钟的逆转录反应，就能够对各种长度的目标片段进行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。

3. 提高了与 Realtime PCR 试剂的兼容性

ReverTra Ace qPCR RT Kit 采用了对于 Realtime PCR 反应体系的影响程度最小的成分，即使在 PCR 反应中添加了最多 20% 液量的逆转录反应液，也能表现出良好的反应曲线（已通过使用本公司的 Realtime PCR Master Mix 确认）。最适合用于表达量较少的 mRNA 的高灵敏度检测。

[2] 产品内容

◆本产品包含以下几种试剂，每 10 μl 反应体系可使用 200 次。

所有试剂请均保存在 -20°C 条件下。

试剂名	保存条件	容量
5×RT Buffer (Reaction Buffer+ MgCl_2 +dNTPs)	-20°C	400 μl
Enzyme Mix (ReverTra Ace reverse transcriptase +RNase Inhibitor)	-20°C	100 μl
Primer Mix (Random Primer+Oligo(dT) Primer)	-20°C	100 μl
Nuclease-free Water	-20°C	1000 $\mu\text{l} \times 2$

5×RT Buffer

含有反应缓冲液、 MgCl_2 、dNTPs 等 5 倍浓度的逆转录反应液 Buffer。溶解时，可能会出现白色沉淀，但不影响其品质。请使用振荡器等仪器使其混合均匀，等完全溶解之后再使用。

Enzyme Mix

含有本公司高性能逆转录酶 ReverTra Ace 和 RNase Inhibitor 的混合酶液。 -20°C 条件下不会冻结。

Primer Mix

含有 Random Primer 和 Oligo(dT) Primer 的混合引物，以最恰当的比例混合，对于各种不同长度的目标片段都能进行高效率的逆转录反应。

Nuclease-free Water

Nuclease-free 级别的灭菌蒸馏水。为避免影响聚合酶的活性，未经过 DEPC 处理。

[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、98°C、以及 65°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。

通过 AGPC(Acid Guanidium-Phenol-Chloroform) 法等提纯的 Total RNA 中，混有基因组 DNA。对于在检测的目的基因中存在很多假基因的情况，以及跨内含子位置不能设计引物的情况，可能是因为由混入的基因组 DNA 产生的假阳性信号引起的。请采取必要的措施（如：DNase I 等）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](#)>。

• 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

把 RNA 在 65°C 条件下进行 5 分钟后，立即放于冰上冷却。

- 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。
- 在进行以上步骤处理的时候，请不要添加 5×RT Buffer 和酶。

(2) 反应液的配制

反应液组成

Nuclease-free Water	up to 10 μ l
5×RT Buffer	2 μ l
RT Enzyme Mix	0.5 μ l
Primer Mix	0.5 μ l
RNA	0.5pg-1 μ g
<hr/>	
Total volume	10 μ l

- 除了在本试剂盒内添附的 Primer Mix 之外，也可以使用基因特异性引物 (Gene Specific Primer)。此时，在反应体系中添加的最终浓度为 0.5pmol/ μ l (每 10 μ l 反应体系添加 5pmol)。

(3) 逆转录反应

在 37°C 条件下，进行 15 分钟的逆转录反应。

↓

在 98°C 条件下，进行 5 分钟的酶失活反应。

↓

反应结束之后，请保存于 4°C 或者 -20°C 条件下。在进行 Realtime PCR 反应时，请在作为模板的反应液内直接添加或者稀释之后添加。

- 此温度条件是最适合本试剂盒组成成分的条件，一旦改变此温度条件，除了影响酶的活性之外，对引物的退火效率、RNA 的清除效率、以及逆转录反应后的酶失活效率等也会产生很大的影响。摸索条件的时候，请一定要基于此温度条件来进行实验。
- 把逆转录反应液添加到 Realtime PCR 反应液内时，请不要超过 20% 的量。添加过量的逆转录反应液，会降低 PCR 的反应效率，不能进行准确的定量。
- 在使用基因特异性引物的情况下，特别是使用相同序列的逆转录引物和 PCR 引物的时候，在逆转录反应时的非特异性退火是导致 PCR 非特异性扩增产物产生的原因。此时，提高逆转录反应的温度（至 42-50°C）可得到改善。

[5] 相关操作步骤

1. 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）

Nuclease-free Water	up to 10 μ l
Total RNA (<10 μ g)	X μ l
10 \times DNase I Buffer (10mM Tris-Cl, pH7.6, 2.5mM MgCl ₂ , 0.5mM CaCl ₂)	1 μ l
RNase-free DNase I (10U/ μ l)	0.5 μ l
Total volume	10 μ l

配制好以上的反应混合液后，置于冰上反应 10~30 分钟。

(2) 提纯（可使用一般的提纯试剂盒）

在反应液内添加 100 μ l 的 Nuclease-free Water、100 μ l 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 100 μ l 的氯仿后使其混合。

↓

12,000rpm、5 分钟的离心后，回收上清液。

↓

添加 100 μ l 的 5M 醋酸铵、200 μ l 的异丙醇，使其混合后置于 -20 $^{\circ}$ 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。

2. Poly(A)⁺ RNA 提纯法

在进行检测表达量较少的遗传基因时, 从 Total RNA 中提取 poly(A)⁺ RNA 作为模板使用, 可以提高灵敏度。在此介绍一个 poly(A)⁺ RNA 提纯法的例子: 通过使用 Oligo(dT) 结合磁珠的专用提纯试剂盒 MagExtractor -mRNA- (Code No. NPK-801) 的方法。

(1) DNase I 反应液的配制和提纯前的处理

反应液组成 (例)

MagExtractor -mRNA- 溶出液	up to 100 μ l
Total RNA (<100 μ g)	X μ l
10 \times DNase I Buffer	10 μ l
RNase-free DNase I (10U/ μ l)	1 μ l
Total volume	100 μ l

配制好以上的反应混合液后, 置于冰上反应 15 分钟。

↓

在反应液内添加 400 μ l 的溶解液 (含 2- 巯基乙醇) 和 800 μ l 的吸附液。

(2) 反应和提纯

在新的 1.5ml 离心管内加入 250 μ l 磁珠。

↓

使用磁力架 *Magical Trapper* (Code No.MGS-101) 或离心机等进行固液分离 (B/F 分离) 后, 弃上清液。

↓

添加上述经过事先处理的 Total RNA 液。

↓

用 vortex 充分搅拌 (至均匀程度) 后, 在室温下放置 10 分钟。

↓

进行固液分离 (B/F 分离) 后, 弃上清液。

↓

添加 1ml 的洗净液。

↓

用 vortex 充分搅拌 (至均匀程度)。

↓

进行固液分离 (B/F 分离) 后, 弃上清液。

↓

添加 1ml 的洗净液。

↓

(转下页)

(接上页)



用 vortex 充分搅拌 (至均匀程度)。



进行固液分离 (B/F 分离) 后, 弃上清液。



添加 1ml 的洗净液。



用 vortex 充分搅拌 (至均匀程度)。



进行固液分离 (B/F 分离) 后, 弃上清液。



进行离心后, 再弃上清液。



添加适量的溶出液。



用 vortex 充分搅拌 (至均匀程度)。



65°C、2 分钟。



用 vortex 充分搅拌 (至均匀程度)。



离心。



进行固液分离 (B/F 分离) 后, 回收含有 poly(A)⁺ RNA 的上清液。

- MagExtractor -mRNA- 的标准操作, 需要反复进行 2 次上述的提纯。经过 2 次反复提纯, 能够清除 1 次提纯未能完全清除的 rRNA 和基因组 DNA。通常情况下, 只需提纯 1 次, 但如需要获取高纯度的 poly(A)⁺ RNA 时, 请进行 2 次提纯。
- 关于此提纯法的详细介绍参考 MagExtractor -mRNA- 附带的使用说明书。

[6] 常见问题

1. 在 Realtime PCR 时检测无信号，或者信号出现延迟。

原因	对策
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 的量过多或者过少	经确认，使用本产品时，添加 1pg-2μg 范围的 RNA 的量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。
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记载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。

2. 在 Realtime PCR 时检测到非特异性的信号。

原因	对策
发生引物的非特异性退火的情况（使用基因特异性引物时）	使用基因特异性引物进行逆转录时，引物的非特异性退火是在 PCR 时出现非特异性信号的重要因素。提高逆转录反应的温度，可以有效地提高退火的特异性。请把反应温度设定在 42°C -50°C 的范围内。

[7] 相关产品

Realtime PCR 试剂

品名	规格	Code No.
Realtime PCR 用 Master Mix (Probe Assay 用) Realtime PCR Master Mix	1ml×5	QPK-101
Realtime PCR 用 Master Mix (SYBR Green Assay 用) SYBR Green Realtime PCR Master Mix	1ml×5	QPK-201
Realtime PCR 用 Master Mix (SYBR Green Assay 用) SYBR Green Realtime PCR Master Mix -Plus-	1ml×5	QPK-212
Realtime PCR 用 Master Mix (Probe Assay 用) THUNDERBIRD Probe qPCR Mix	1.67ml×3	QPS-101
Realtime PCR 用 Master Mix (SYBR Green Assay 用) THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix	1.67ml×3	QPS-201

配制 RNA 的相关试剂

品名	容量	Code No.
利用磁珠简单地方便地提纯 mRNA 的试剂盒 MagExtractor -mRNA-	5 次	NPK-801F
利用磁珠简单地方便地提纯 Total RNA 的试剂盒 MagExtractor -RNA-	100 次	NPK-201
通过磁珠简单地进行提纯的专用磁力架 Magical Trapper	1 个	MGS-101

Realtime PCR 用预混型 cDNA 合成试剂盒

品名	规格	Code No.
Master Mix Version ReverTra Ace qPCR RT Master Mix	200 次	FSQ-201
去除基因组 DNA 试剂 +Master Mix Version ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	200 次	FSQ-301

One-step PCR 试剂

品名	规格	Code No.
One-step Realtime PCR 用 Master Mix (Probe Assay 用) RNA-direct Realtime PCR Master Mix	500 μ l \times 5	QRT-101
One-step Realtime PCR 用 Master Mix (SYBR Green Assay 用) RNA-direct SYBR Green Realtime PCR Master Mix	500 μ l \times 5	QRT-201

◆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:021-58794900 Fax:021-58794901

E-Mail:sales@bio-toyobo.cn

产品内容・技术相关咨询

Tel:021-58794142 Fax:021-58795259

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

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

代理商资料：