GoScript™反转录系统简明操作指导

注意：这是节选操作步骤，详细英文说明书TM316见 www.promega.com/protocols/

适用产品目录号： A5000, A5001, A5003, A5004

I. 说明：GoScript™反转录系统包含进行反转录所需的所有组分。采用A5000/A5001，按以下步骤进行，可快速完成RNA的反转录，得到的cDNA，适用于绝大部分的实验（包括Real Time PCR、普通PCR、基因克隆等）。

II. 快速操作步骤 (一般的RNA模板，快速反应条件仅适合于下游做qPCR)

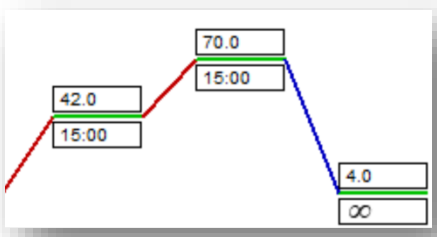
1. 将GoScript™反转录系统中各组分取出置于冰上融化后，按下表加入各组分，配制RT-Mix（按总反应体积20 µl计算；通常配制RT-Mix要比实际样品数多1-2个，以防止液体挂壁造成的体积损失）：

组分	每反应加入量	乘以样品个数___个
Nuclease-Free Water	0.6µl	_____µl
GoScript™ 5X Reaction Buffer	4µl	_____µl
$MgCl_2$(25mM)	4µl	_____µl
Oligo(dT)$_{15}$Primer (500 µg/ml)	0.5µl	_____µl
Random Primers (500 µg/ml)	0.5µl	_____µl
PCR Nucleotide Mix	1µl	_____µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0.4µl	_____µl
GoScript™ Reverse Transcriptase	1µl	_____µl
总体积	12µl	_____µl

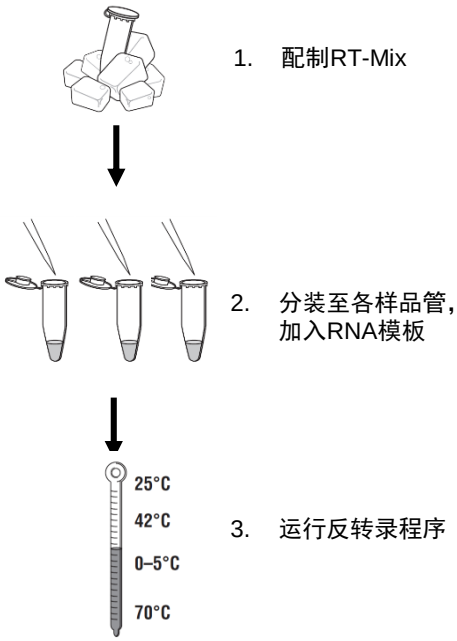
2. 将配好的RT-Mix分至各反应管，加入总RNA（1-2 µg），并加水将体积补齐至20µl：

组分	每反应加入量
RT-Mix	12µl
RNA(1-2µg)	_____µl
Nuclease-Free Water	_____µl
总体积	20µl

3. 设置以下程序进行反转录反应，包括42℃、15min的延伸和70℃、15min的反转录酶灭活：



简易流程图



注: 反转录程序完成后得到的cDNA可直接用于Real Time PCR定量，或储存于-20℃备用。进行后续Real Time PCR定量实验时，cDNA的用量建议不超过总反应体积的1/5。

本简化程序来源于实验经验，合成得到的cDNA仅适用于Real Time PCR定量。如果需要进行基因克隆等其他实验或进行Real Time PCR实验后目的基因的Ct值大于30，建议采用GoScript反转录系统的一般操作程序或参考完整操作手册优化条件以最大限度提高反转录效率，提高检测灵敏度。

GoScript™ 反转录系统简明操作指导

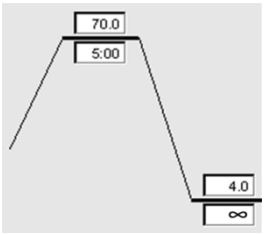
当待测目的基因mRNA长度较长或GC含量较高（>60%）时，可参考完整操作手册进行条件优化。以下加样操作要在冰上完成。

III. 标准操作步骤(mRNA长度较长或GC含量较高,>60%时)：

1. 取一定量模板RNA加入引物。

组分	每反应加入量
RNA (最高5µg/reaction)	_____µl
Random Primers(0.5 µg /reaction)	1µl
Oligo(dT)$_{15}$Primer(0.5 µg/reaction)	1µl
Nuclease-Free Water (加至10µl)	_____µl
总体积	10µl

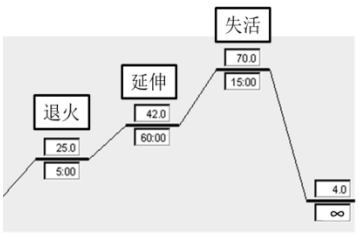
2. 将模板RNA与引物的混合物进行70℃、5 min预变性，完成后取出置于冰上。



3. 配制RT-Mix，向每个样品管加入10µl。

组分	每反应加入量	乘以样品个数___个
Nuclease-Free Water	1.6µl	_____µl
GoScript™ 5X Reaction Buffer	4µl	_____µl
$MgCl_2$(25mM)	2µl	_____µl
PCR Nucleotide Mix	1µl	_____µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0.4µl	_____µl
GoScript™ Reverse Transcriptase	1µl	_____µl
总体积	10µl	_____µl

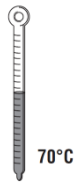
4. 设置反转录程序，包括退火、延伸、逆转录酶失活三步。程序完成后得到cDNA。



简易流程图



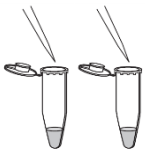
1. 混合模板RNA和引物



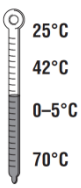
2. 模板RNA与引物的混合物70℃预变性



预变性完成置于冰上



3. 配制RT-Mix,分装至各样品管，每管加入10µl模板RNA与引物的混合物。



4. 运行反转录程序

GoScript™反转录系统简明操作指导

IV.反转录系统的条件优化

GoScript反转录系统能以各种RNA为模板进行高效的第一链cDNA合成，如总RNA、poly(A)+mRNA或人工合成的RNA转录本。最终的cDNA产量受多种因素影响：包括起始模板RNA的质量、目的基因在总RNA中的丰度、镁离子浓度、引物的选择和反应温度等。

反转录系统的优化请参照以下内容或GoScript系统的完整操作手册。实时荧光定量PCR系统的优化请参阅GoTaq®qPCR Master Mix的中文操作手册 (可从www.promega.com下载)。

1. RNA模板：

成功的反转录依赖模板RNA的纯度和完整性。创造和维持无RNase环境，使用无RNase、DNase的离心管、枪头，戴手套操作，使用无核酸酶的水是保证RNA提取成功的最基本条件。通过检测RNA在A260的吸光度来测定RNA的浓度是判断RNA是否提取成功的第一步。读取浓度的同时，通过A260/A280的吸光度比值来判断RNA的纯度。A260/A280的比值越接近2，表示RNA的纯度越高。从哺乳动物细胞或组织中提取得到的总RNA，还可以通过跑胶的方法判断RNA的完整性。取约1 μgRNA，在1%琼脂糖凝胶中电泳，如果28S的条带亮度是18S的两倍，则表示RNA完整性很好，没有被RNase降解。

各种浓度的总RNA、poly(A)+mRNA或合成的RNA转录本都可以作为反转录的模板。最佳的模板RNA用量对不同的模板可能会有不同。一般情况下，每20 μl体系可反转录的RNA量为：总RNA 5μg–1pg或mRNA500ng–100fg或体外转录得到的RNA分子1×10^{10}–10 copies。

2. 反转录引物序列和浓度：

对RNA进行反转录时，反转录引物有多种选择，Oligo(dT)、随机引物Random Primer、Oligo(dT) + Random Primer、基因特异性引物等。用来进行反转录的引物及其常用的推荐浓度如下表所示，

引物	常用终浓度	调整范围
$Oligo(dT)_{15}$	0.025μg/μl	0.01–0.125μg/μl
Random Primer	0.025μg/μl	0.01–0.1μg/μl
$Oligo(dT)_{15}$＋Random Primer	0.025μg/μl each primer	Each 0.01–0.1μg/μl
Gene-specific primer	1μM	0.5–1μM

当需要反转录细胞总RNA时，可以同时加入$Oligo(dT)_{15}$Primer与Random Primer，以最大限度提高反转录效率。如果研究者仅需反转录mRNA得到cDNA，可以只加入$Oligo(dT)_{15}$Primer。如果研究者只需要对特定基因进行反转录，则仅需加入基因特异性引物。

如果下游实验是通过实时荧光定量PCR检测基因表达，建议同时加入$Oligo(dT)_{15}$Primer与Random Primer，可提高反转录效率。

3. 镁离子浓度：

GoScript反转录系统提供单独的氯化镁以优化反转录条件，GoScript™ 5×Reaction Buffer中不含镁离子。GoScript反转录酶在有镁离子存在时才有活性。对于大多数反转录反应，建议加入氯化镁至镁离子终浓度为2.5 mM以得到最佳结果。对于长片段RNA的反转录，可以降低镁离子浓度以提高延伸的完整性；短片段RNA的反转录，可以提高镁离子浓度以提高反转录的效率。需要调整镁离子浓度时，可在1.5 mM-5 mM范围内进行，必要时以0.25mM为一个梯度进行多个镁离子浓度的反转录反应，通过比较反转录效果来判断最合适的镁离子浓度。

GoScript™反转录系统简明操作指导

4. RNA的变性：

为得到最佳的反转录效果，RNA模板和反转录引物需要首先进行预变性以解除RNA的发卡、茎环等二级结构。预变性的效果对不同的模板会有不同，通常可参考下表的经验结果来调整。

调整方法	适用的条件
改变预变性温度	标准操作步骤中推荐的预变性温度为70℃，最佳的预变性温度可在65-75℃之间调整。通常情况下，提高变性温度有利于复杂二级结构RNA的反转录。降低变性温度有利于保持RNA的质量以合成长片段的cDNA。
“热启动”法cDNA合成	将70℃变性后的模板与反转录引物混合物直接加入42℃的RT-Mix中，可促进拥有复杂二级结构RNA反转录得到全长cDNA。
取消预变性	将模板RNA、反转录引物直接与RT-Mix混合后进行cDNA的合成，可以节省操作时间。当合成的cDNA对片段长度要求不高或检测灵敏度降低也能接受时可以采用。

5. cDNA合成：

不同的模板反转录时所需要的最佳退火、延伸条件可能不同，进行优化时可能参考以下的经验结果进行：

反转录条件	优化方法
退火	提高退火温度(>25℃)有利于提高基因特异性引物的特异性。
	增加退火时间(>5 min)可促进引物与RNA模板的结合，提高检测的灵敏度。
延伸	延伸时间60min可缩短以节省时间，最短可减至5min。绝大多数cDNA合成可在15min内完成。
	如果需要增加≥12kb的全长cDNA的产量，可降低延伸温度(<42℃)。
	如果目的基因RNA拥有复杂二级结构，可提高延伸温度(>42℃)。
	要提高cDNA产量，可增加延伸时间至1-2 hr。
	为提高反转录效率，可采用较复杂的延伸条件(如设置40个循环的程序，每个循环包括37℃1min的延伸和50℃1sec的延伸两步)

6. 下游实时荧光定量PCR体系的配制：

使用GoScript反转录系统合成的cDNA产物可直接使用GoTaq® qPCR Master Mix进行下游的实时荧光定量PCR。cDNA产物的用量建议不超过后续实时荧光定量PCR反应体积的20%。

根据目的基因在总cDNA产物中的含量不同，有时对cDNA进行稀释会得到更佳的结果。产物能否稀释取决于cDNA的产量、反转录时RNA的用量和待测基因的丰度。需要稀释时向cDNA产物中加入无核酸酶的水即可。