



08-03

ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit
(Code No.:FSQ-101)

使用说明书

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，适当使用保护用品，安全操作。

【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 目标的短链 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）。

◆本产品的特征◆

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（专利申请中）。

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 10μl 反应体系可使用 200 次。

所有试剂请均保存在-20℃ 条件下。

试剂名	保存条件	容量
5 × RT Buffer (Reaction Buffer + MgCl ₂ + dNTPs)	-20℃	400μl
Enzyme Mix (ReverTra Ace [®] reverse transcriptase + RNase Inhibitor)	-20℃	100μl
Primer Mix (Random Primer + Oligo(dT) Primer)	-20℃	100μl
Nuclease-free Water	-20℃	1000μl x2

5×RT Buffer

含有反应缓冲液、MgCl₂、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。

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标之外，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。对于在检测的目标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。

•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 10μl
5×RT Buffer	2μl
RT Enzyme Mix	0.5μl
Primer Mix	0.5μl
RNA	0.5pg-1μg
Total volume	10μl

- 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/μl（每10μl反应体系添加5mpol）。

(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，特别是使用保持同一配对的逆转录引物和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。

(1)反应液的配制和反应

反应液组成（例）

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

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℃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 100μl
Total RNA(<100μg)	xμl
10×DNase I Buffer	10μl
RNase-free DNase I(10U/μl)	1μl
Total volume	100μl

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400μl的溶解液（含2-巯基乙醇）和800μl的吸附液。

(2) 反应和提纯

在新的1.5ml离心管内加入250μl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（使用遗传基因特异性引物时）	使用遗传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 x1 1ml x5	QPK-101T QPK-101
Realtime PCR用Master Mix (SYBR [®] Green Assay用) SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix	1ml x1 1ml x5	QPK-201T QPK-201

配置 RNA 的相关试剂

产品名	规格	Code No.
利用磁珠简单方便地提纯mRNA的试剂盒 MagExtractor[®] -mRNA-	5次	NPK-801
利用磁珠简单方便地提纯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

One-step PCR 试剂

产品名	规格	Code No.
One-step Realtime PCR用Master Mix (Probe Assay用) RNA-direct[™] Realtime PCR Master Mix	500μl x2 500μl x5	QRT-101T QRT-101
One-step Realtime PCR用Master Mix (SYBR [®] Green Assay用) RNA-direct[™] SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix	500μl x2 500μl x5	QRT-201T 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:021-5879-4900 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：