

RT-PCR Kit (逆转录试剂盒)

货号/规格: R1011/20 次, R1012/100 次

产品说明

RT-PCR Kit(逆转录试剂盒)是专为两步法 RT-PCR 第一步实验配制的、具有高灵敏度的 RT-PCR 反应系统。该系统合理配备了与 cDNA 第一链合成反应相关的各种组分,优化的体系保证了 M-MLV 具有高效的逆转录酶活性,所得 cDNA 对后续的 PCR 或定量 PCR 实验兼容性好,可用于检测稀有基因的表达、从极少数细胞中定量检测特定 mRNA 的表达水平、克隆特定基因的 cDNA 片段等。

M-MLV 逆转录酶是由一个 71 kD 的单亚基组成的重组型 DNA 逆转录聚合酶。可以催化以 RNA 或 DNA:RNA 杂交链为模板的互补 DNA 的聚合反应。本酶经修饰 RNase H 活性比普通的逆转录酶要弱很多,因此在合成第一链 cDNA 的过程中,可保证 RNA 的降解程度较低,从而使得率提高。

产品组分

货号	R1011 (20 次)	R1012 (100 次)
M-MLV (200U/μl)	20 μl	100 μl
RNasin (40U/μl)	12 μl	60 μl
Oligo d(T) ₁₅ Primer (50 μM)	20 μl	100 μl
Random primer (50 μM)	20 μl	100 μl
5xfirst-strand buffer	80 μl	400 μl
RNase-free ddH ₂ O	1 ml	1 ml×5
dNTPs(10mM each)	50 μl	250 μl

R1011 可进行 20 次逆转录反应,R1012 可进行 100 次逆转录反应 (20 μl 标准 PCR 反应体系,每次使用 M-MLV 1μl)。

M-MLV 储存液

20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% NP-40, 50% glycerol

5xfirst-strand buffer 成分

250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50mM DTT

质量检测

逆转录酶活性检测

使用[32P]dCTP 作为标记,200 U 的 M-MLV 以 1μg、1.2 kb 的 RNA 为模板进行逆转录反应,最低可得到 120ng 的 cDNA,所得 cDNA 长度 > 全长的 90%。

核酸外切酶活性检测

混合 50ng 的标记 DNA 或 RNA 与 200U M-MLV 在 1×反应缓冲液体系中,37°C 温浴 1 h,检测 DNA 和 RNA 降解都不到总量的 1%。

适用范围

第一链 cDNA 合成, cDNA 文库构建, RT-PCR, 引物延伸, 3'和 5' RACE

注意事项

- 成功的 cDNA 合成来自高质量的 RNA。高质量的 RNA 至少应保证全长的完整性并且不含逆转录酶的抑制剂,如 EDTA 或 SDS。用于 cDNA 合成反应的溶液试剂尽可能用 DEPC 进行处理,并在高压灭菌后使用。有些试剂不能用高压灭菌处理时,首先用经过灭菌的器具、水等配制溶液后,再将溶液进行过滤除菌处理。
- 为了增加贮存 RNA 样品的稳定性,可以将 RNA 溶解在去离子的甲酰胺中,存于-70°C。用于保存 RNA 的甲酰胺一定不能含有降解 RNA 的杂质。来源于胰脏的 RNA 至少可以在甲酰胺中保存一年。当准备使用 RNA 时,可以使用下列方法沉淀 RNA:加入 NaCl 至 0.2 M 同时加入 4 倍体积的乙醇,室温放置 3-5 min,10,000 rpm 离心 5 min。
- 在逆转录反应中经常加入 RNase 抑制剂 (RNasin) 以增加 cDNA 合成的长度和产量。在第一链合成反应中, RNase 抑制剂在缓冲液和还原剂 (如 DTT) 存在的条件下加入,因为 cDNA 合成前的过程会使抑制剂变性,从而释放出 RNase。但是 RNase 抑制剂仅防止 RNase A, B, C 对 RNA 的降解,并不能防止皮肤上的 RNase,因此尽管使用了 RNase 抑制剂,也要小心不要从手指上引入 RNase。
- 较高的保温温度有助于 RNA 二级结构的打开,增加反应的产量。
- 使用简单的 RNA 纯化方法即可获得满足 RT-PCR 反应的 RNA,但为了保证实验的成功率,建议使用 GTC 法 (异硫氰酸胍法) 制备的高纯度 RNA。
- 为防止 RNA 降解,应尽量避免反复冻融,最好保存于-70°C。
- 最佳的 PCR 反应条件,因 PCR 扩增仪的不同而不同,所以在您的样品之前最好先试做一下 control 反应,以确定最佳的 PCR 反应条件。

- cDNA 产物应置于-20℃保存。
- 当以 cDNA 为模板进行 PCR 之前，使用 RNase H 处理 cDNA，可以提高 PCR 反应的灵敏度。

操作步骤

1 在冰浴的无菌离心管中配制下列混合物

RNA	1-5 μg
Oligo (dT) ₁₅ 或 Random primer	1 μl
RNase-free ddH ₂ O	To 13.4 μl

2 进行变性退火反应

70℃温浴 5 min，简短离心后冰浴 5 min；

3 在上述离心管中配制反转录反应液

上述反应液	13.4 μl
5× first-strand buffer	4 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl
RNasin	0.6 μl
M-MLV	1 μl
Total	20 μl

4 按下列条件进行反转录反应

Oligo (dT)₁₅ : 42℃温浴 60 min；

Random primer: 37℃温浴 60 min。

5 终止反应

70℃温浴 5 min 终止反应，置冰上进行后续实验或-20℃保存。

6 用 RNase-free ddH₂O 将反应体系稀释到 50μl，取 2-5μl 进行 PCR 扩增反应。

Q&A

- 问：反转录怎样选择使用哪种引物？

答：反转录引物的选择，应结合实验的具体情况，选择以下三种引物，即：Random primer、Oligo (dT) primer 或特异性引物。对于没有发夹结构的短链 mRNA，上述三种引物都可以

使用；一般情况下反转录引物的选择请参照以下说明：

Random primer: 适用于长的或具有 Hairpin 构造的 RNA。包括 rRNA、mRNA、tRNA 等在内的所有 RNA 的反转录反应都可使用本引物。

Oligo (dT) primer : 适用于具有 Poly (A)⁺ Tail 的 RNA。（注意：原核生物的 RNA、真核生物的 rRNA、tRNA 以及某些种类的真核生物的 mRNA 等不具有 Poly (A)⁺ Tail）。

特异性引物: 最特异的引发方法是用含目标 RNA 互补序列的寡核苷酸作为引物，第一链的合成可由与 mRNA3'端最靠近的配对引物起始。用此类引物近产生所需要的 cDNA，导致更为特异的 PCR 扩增。

- 问：反转录引物的用量怎样？

答：普通情况下 Oligo (dT)₁₅ 和 Random primer 均用 1 μl；2 kb 以上的长片段 cDNA 合成时，Random primer 的使用量为 0.4 μl (20pmol)；Real Time PCR 反应时，Random primer 引物使用 2 μl (100 pmol) 可以得到较好的实验结果；也可以使用 Gene Specific Primer，此时引物终浓度为 0.1 μM。

- 问：试剂盒及反转录用的 RNA 应如何保存？

答：试剂盒及 cDNA 产物应在-20℃保存，RNA 应避免反复冻融，使 RNA 在冰浴中保持融化状态。

本品仅供科学研究使用。