

版本号: ER121221

Quant Reverse Transcriptase

目录号: ER103

产品内容

产品组成	ER103-02 25 rxn	ER103-03 50 rxn	ER103-04 100 rxn
Quant Reverse Transcriptase	25 μ l	50 μ l	2 \times 50 μ l
10 \times RT Buffer	70 μ l	150 μ l	2 \times 150 μ l

储存条件

-20 $^{\circ}$ C 保存。

产品简介

Quant Reverse Transcriptase与通常使用的Moloney鼠白血病病毒来源的MMLV和鸟成髓细胞病毒来源的AMV不同，是一种使用大肠杆菌工程菌进行重组表达的全新高效逆转录酶。

该酶能够高效转录多种RNA模板，最大限度将RNA转录成cDNA第一链，由于该酶具有与RNA高亲合性的特点，其能通读GC含量高，二级结构复杂的RNA模板，操作简单迅速。

产品特点

合成cDNA第一链的产率更高；能够作用于GC含量高，二级结构复杂的RNA模板；操作简单快速；稳定性好。

适用范围

RT-PCR，实时荧光定量RT-PCR，cDNA文库构建，SAGE（基因表达连续分析），引物延伸，3' 和5' RACE等。

注意事项

1. 下列操作步骤适用于模板量为50 ng-2 μg的总RNA，如果总RNA量大于2 μg，请按比例扩大反应体系。
2. 在冰上进行操作，防止RNA发生降解。
3. 不需分开变性和退火两个步骤。但是对于二级结构很复杂的RNA模板，推荐使用变性步骤，即在操作步骤之前，将模板RNA在65℃ 孵育5 min后迅速转移到冰上，进行下一步操作。
4. 当使用Oligo-dT为引物时，引物长度要求12个核苷酸以上，推荐使用终浓度为1 μM。
5. 小心操作，防止RNA降解或实验中的交叉污染。

对RNA模板的要求

逆转录酶以RNA为模板合成第一链cDNA，模板RNA的质量和数量直接影响逆转录的结果。

1. 模板的完整性：模板RNA的完整性对逆转录非常重要，若RNA模板中含有RNase酶将降解模板RNA，最后导致cDNA产物的量少甚至无cDNA产物。
 2. 模板的纯度：若RNA模板中含有蛋白、盐离子、EDTA、乙醇、酚等杂质，将影响逆转录酶的活性，最后影响逆转录结果。
 3. 模板的加量：以下操作步骤适用于模板RNA量为50 ng-2 μg，如果模板RNA的量大于2 μg，请按比例扩大反应体系。
-

操作步骤

使用Quant Reverse Transcriptase合成第一链cDNA

50 ng-2 µg总RNA可建立20 µl反应体系。

1. 将模板RNA在冰上解冻；引物、10×RT Buffer、dNTP混合液、无RNase的水在室温（15-25℃）解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。
2. 用冰预冷的1×RT Buffer，稀释RNase抑制剂至终浓度为10 U/µl(从市场上购买的RNase抑制剂浓度通常为40 U/µl)。彻底混匀，涡旋振荡时间不超过5 sec，短暂离心以收集残留在管壁的液体。
3. 按照表1的逆转录体系配制混合液，彻底混匀，涡旋振荡时间不超过5 sec。简短离心，并置于冰上，RNA模板请于第5步加入。

注意：如果下游进行荧光定量PCR实验，建议使用10 µl逆转录反应体系，各反应组分相应减半。从而可以与RealMasterMix（SYBR Green）反应次数匹配(FP202-01, 50 µl×50 rxn；FP202-02, 50 µl×200 rxn)。

4. 如果要做个逆转录反应，可以将配制好的混合液后分装在单个反应管中，置于冰上。
5. 将模板RNA（50 ng-2 µg）加入到混合液中，彻底混匀，涡旋振荡时间不超过5 sec，简短离心以收集管壁残留的液体。
6. 37℃孵育60 min。
7. 将逆转录的产物进行后续PCR反应和荧光定量PCR。

表1 逆转录反应体系

组成成分	体积	终浓度
10×RT Buffer	2 µl	1×
dNTP混合液（2.5 mM each）	4 µl	0.5 mM each dNTP
Oligo-dT 引物（10 µM）	2 µl	1 µM
RNase抑制剂（10 U/µl）	1 µl	10 U（20 µl反应体系）
Quant Reverse Transcriptase	1 µl	（20 µl反应体系）
RNase-Free ddH ₂ O	X µl	
模板RNA，在第5步加入	X µl	
总体积	20 µl	

注意

1. 若后续实验为实时荧光定量PCR，逆转录产物的加量应不超过PCR体系终体积的1/10，例如50 μl 的PCR反应体系，逆转录产物的加量应不超过5 μl 。
2. 将逆转录产物置于冰上，再进行后续PCR反应；如果需要长时间保存，请置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

PCR检测

两步法RT-PCR

当使用两步法RT-PCR时，RNA模板先逆转录成cDNA链，然后再加入到PCR反应体系中；逆转录反应和PCR反应在两个不同的反应体系中完成。随机引物，oligo-dT引物和基因特异性引物均可用于两步法RT-PCR。具体步骤：

1. 按照以上逆转录反应操作步骤将模板RNA逆转录成cDNA。
2. 向PCR反应体系中加入逆转录产物，注意逆转录产物的加量应不超过PCR体系终体积的1/10，例如50 μl 的PCR反应体系，逆转录产物的加量应不超过5 μl 。
3. 进行PCR扩增。

一步法RT-PCR

当使用一步法RT-PCR时，逆转录和PCR的过程在同一反应体系中进行。所有的反应试剂（逆转录反应及PCR反应所需试剂）加入至同一反应体系中。首先，cDNA链合成需要在37 $^{\circ}\text{C}$ 进行，Taq DNA聚合酶在该温度下活力很低，当逆转录反应完成后，升高温度使逆转录酶失活，此时Taq DNA聚合酶开始扩增cDNA。

由于逆转录与PCR反应在同一反应体系中进行，使用同一反应buffer，两者反应条件不能同时得到优化，且逆转录步骤在一些PCR反应buffer中效率很低，因此不推荐使用。
