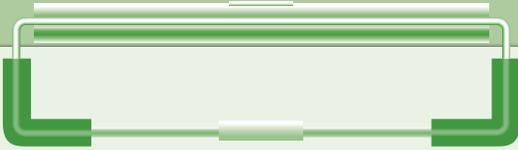


「逆转录」



第3章 目录	3-1
→ 按用途分类的产品流程图	3-2
→ cDNA 合成	3-3
→ RNA 制备	
<i>SuperPrep</i> [®] II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	3-5
→ 逆转录	
ReverTra Ace [®] qPCR RT Master Mix 系列	3-8
ReverTra Ace [®] qPCR RT Kit	3-10
ReverTra Ace - α - [®]	3-12
ReverTra Ace [®]	3-14
→ 相关试剂	
RNase Inhibitor Recombinant type	3-16

INDEX

「逆转录」

{ 按用途分类的产品流程图 }

培养细胞

Realtime PCR 用细胞裂解液的制备

SuperPrep® 系列 → (3-5 页)

- SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR
- SuperPrep® II Cell Lysis Kit for qPCR (Lysis & RT Reagent)

RNA 抽提试剂盒

Total RNA 抽提试剂盒 → (5-6 页)

- MagExtractor™ -RNA-

Viral RNA 抽提试剂盒 → (5-8 页)

- MagExtractor™ -Viral RNA-

细胞裂解液

提纯 RNA

RT-PCR 试剂盒

高效率 RT-PCR 试剂盒 → (2-36 页)

- RT-PCR Quick Master Mix 【简便】

1-step 用 Realtime PCR 试剂盒

【探针法】

- THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit → (1-8 页)
- RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix → (1-12 页)

【SYBR® Green 法】

- RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix → (1-12 页)

cDNA 合成试剂盒

- ReverTra Ace -α® → (3-12 页)

cDNA 合成用基础试剂

高效率逆转录酶 → (3-14 页)

- ReverTra Ace®
- 相关试剂 → (2-39 页) • dNTPs

从细胞裂解液开始的高效率 cDNA 合成

- SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Lysis & RT Reagent) → (3-5 页)

Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒

ReverTra Ace® qPCR RT 系列 → (3-8 页)

- ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover
- ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix
- ReverTra Ace® qPCR RT Kit

高效率 Realtime PCR 试剂盒 (对应高 GC 含量 · 长链 · 粗样品)

- KOD SYBR® qPCR Mix

新一代 Realtime PCR 试剂盒 (重视性能 + 性价比)

THUNDERBIRD® Next qPCR Mix 系列 → (1-17 页)

【探针法】

- THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix

【SYBR® Green 法】

- THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix

高效率 Realtime PCR 试剂盒 (可靠性高)

Realtime PCR Master Mix 系列 → (1-21 页)

【探针法】

- Realtime PCR Master Mix

【SYBR® Green 法】

- SYBR® Green Realtime PCR Master Mix
- SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-

1. RT-PCR 实验中的逆转录反应

(1) 逆转录酶

科研用逆转录酶一般有「病毒来源的逆转录酶」与「微生物来源的具有逆转录活性的DNA聚合酶」两种。病毒来源的逆转录酶一般使用来自M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) 或AMV (Avian Myeloblastosis Virus) 等的逆转录病毒。其中, M-MLV来源的逆转录酶由于合成能力较高而被频繁使用。本公司通过向M-MLV基因的两个位点导入突变, 开发出了合成能力更高的「ReverTra Ace[®]」。该酶被用于以下介绍的两种cDNA合成试剂盒中。

另一方面, 微生物来源具有逆转录活性的DNA聚合酶, 例如Tth DNA polymerase (以下称Tth), 在Mn离子存在条件下具有将RNA模板合成DNA的能力。因此, 使用该酶可在同一离心管完成RT-PCR。而且该酶的最适温度在60℃左右, 因此可在高温下进行逆转录反应, 对容易形成高级结构的RNA的逆转录非常有效, 但不适用于长片段cDNA的合成。

(2) RT-PCR过程中的注意点

Total RNA、mRNA、rRNA、及tRNA都可作为逆转录反应的模板。逆转录时要注意, 尽量不要使用含基因组DNA的RNA。如图1所示, mRNA是基因组DNA转录后, 通过剪接 (splicing) 而形成的成熟的mRNA, 因此基本上含有基因组DNA的序列, 而不小心混入的基因组DNA也同样会被扩增。因此, 一般实验中都会将分离后的RNA进行DNase I处理。同时, 在Exon连接点上设计引物, 或者跨Exon设计引物会比较有效。从理论上讲, 用前一种方法基因组DNA不会被扩增, 而用后一种方法会产生不同大小的产物。

此外, 逆转录用的引物也十分重要。使用病毒来源的ReverTra Ace等逆转录酶时, 主要可以使用如图2所示的三种引物, 例如, 在5'末端附近设计PCR引物时, 使用Oligo dT primer或Random primer的灵敏度不同。而且, 混入部分mRNA被分解的RNA时, 该灵敏度的差异更明显。考虑到该情况, 现在实验中也经常会使用Oligo dT与Random混合的引物Mix。使用预混的两种引物, 可在各种条件下得到稳定的结果。ReverTra Ace[®] qRT PCR Kit 系列 (→ 3-8 页) 中使用的即是该种引物Mix。

使用Tth等进行的1-step RT-PCR中, 用的是Specific引物。一般情况下, 为PCR用设计的Reverse primer、可直接作为逆转录引物使用。通常, 在1-step RT-PCR中不能使用Oligo dT和Random primer。

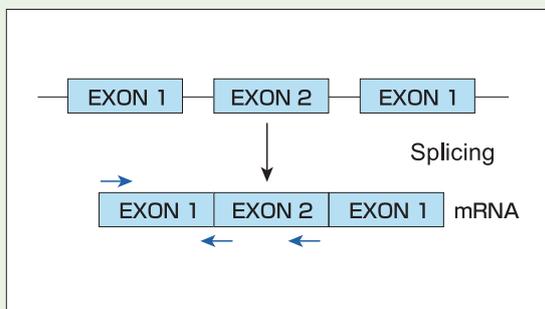


图1 RT-PCR引物的设计

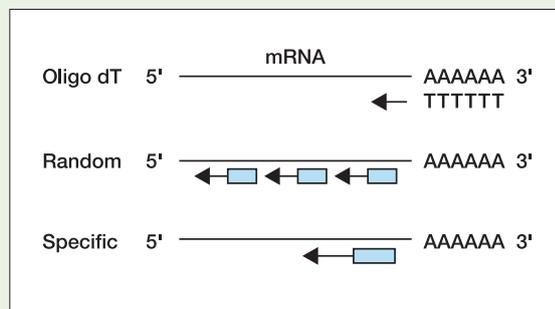


图2 逆转录引物

(3) cDNA合成用试剂盒

本公司生产和销售「ReverTra Ace - α -[®] (→3-12页)」和「ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit系列 (→3-8 页)」两种cDNA合成试剂盒, 其各自的用途如表1所示。

表1 cDNA合成试剂盒的特征

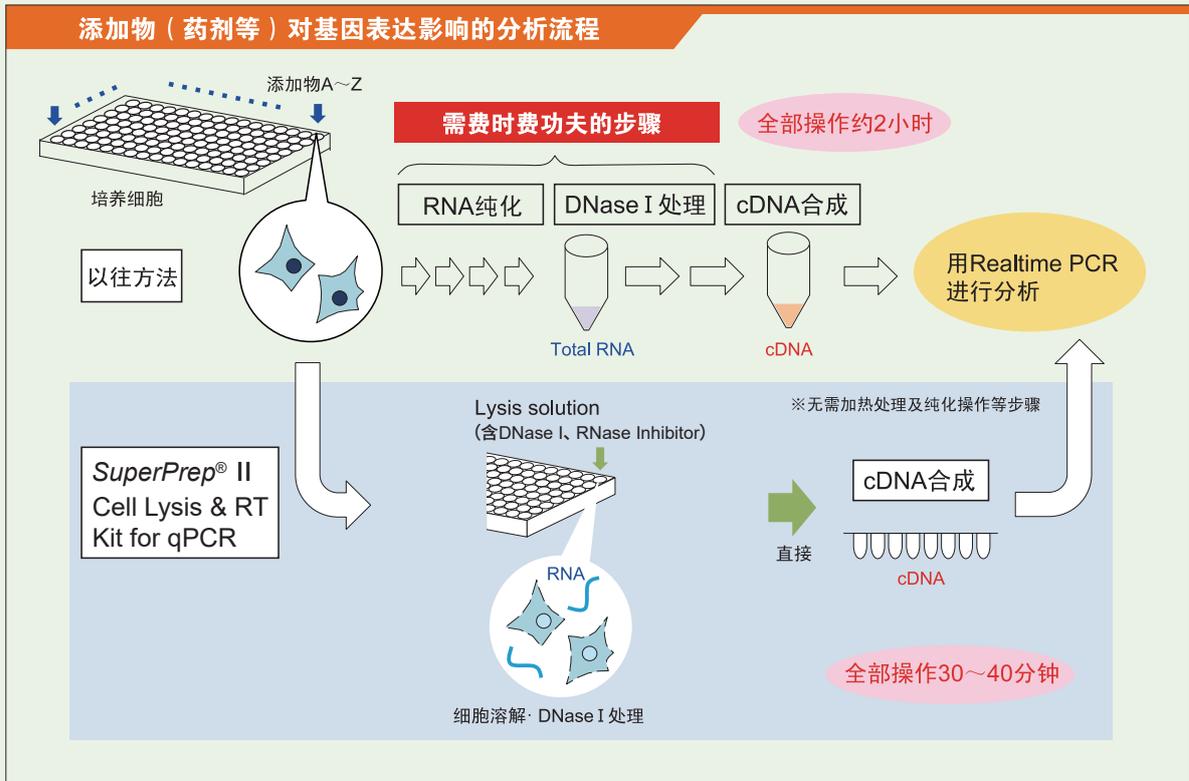
品名	试剂盒组成	备注
ReverTra Ace - α - [®]	逆转录酶、5×RT buffer、dNTPs、Oligo dT primer、Random primer、RNase Inhibitor、Nuclease-free Water	适用于基因克隆用cDNA合成等各种用途的标准试剂盒。
ReverTra Ace [®] qPCR RT Kit	Enzyme Mix、5×RT buffer、Primer Mix、Nuclease-free Water	Realtime PCR用cDNA合成用试剂盒。将酶与RNase inhibitor、dNTP、buffer等预混在一起, 使得操作非常简便。
ReverTra Ace [®] qPCR RT Master Mix (with gDNA Remover)	5×RT Master Mix (Ⅱ) 5×RT Master Mix (Ⅱ) no-RT Control Nuclease-free Water (gDNA Remover, 4×DN Master Mix)	Realtime PCR用cDNA合成用试剂盒。将酶与RNase inhibitor、dNTP、buffer等预混在一起, 使得操作非常简便。(分含有和不含有去除基因组DNA组分的两款。)

(4) 通过细胞裂解液进行高通量cDNA合成

向哺乳类培养细胞及原代培养细胞中添加特定的药剂，使用Realtime PCR法，有望全面分析基因表达量的变化。

SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (→ 3~5页) 中含有“Lysis Reagents”和“RT Reagents”，“Lysis Reagents”是指从96孔板等培养的细胞开始简单制成的含有可作为逆转录反应模板的RNA的细胞裂解液，“RT Reagents”指可从粗样品裂解液开始高效率合成cDNA的逆转录反应试剂。

在细胞裂解这一步中，RNA定量的同时，使用DNase I去除基因组DNA，基因组DNA是产生背景的主要原因。用这种方法得到的含有RNA的细胞裂解液，在冰上至少可以稳定放置6小时。像U937这样RNase活性很高的细胞虽然不适合用这种裂解液的方法，但是使用本试剂，确认可以得到稳定的结果。



另外，RT Reagents是采用了本公司高效率逆转录酶[ReverTra Ace]的Master Mix，可用混有杂质的RNA溶液高效地合成cDNA，合成的cDNA可使用各种Realtime PCR试剂进行分析。

可从培养的细胞开始简便·快速地制备 qPCR 用模板 cDNA。

Realtime PCR 用细胞裂解 & cDNA 合成试剂盒 (使用培养的细胞)

SuperPrep[®] II Cell Lysis & RT Kit for qPCR

SuperPrep[®] II Cell Lysis & RT Kit for qPCR Code: SCQ-401 100次份 ¥4,800

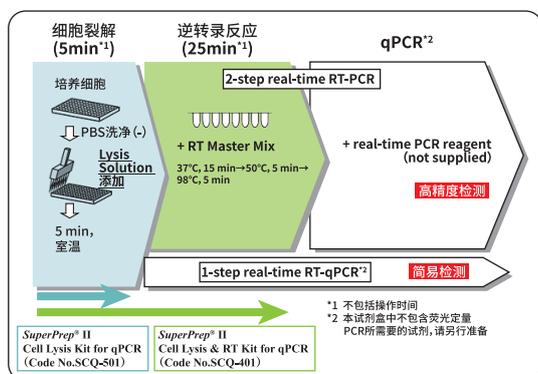
SuperPrep[®] II Cell Lysis Kit for qPCR Code: SCQ-501 100次份 ¥2,400

Code: SCQ-401S 20次份 ¥1,000

Code: SCQ-501 100次份 ¥2,400

※ 使用 96 孔板的情况下, 用量约为 1 包 (100 次份)。

SuperPrep[®] II Cell Lysis & RT Kit for qPCR 是为了能够用荧光定量 PCR 法进行基因表达分析, 从用添附的试剂裂解的细胞开始进行逆转录反应, 简便、快速地配制 cDNA 的试剂, 由细胞裂解试剂 (Lysis Reagents) 和逆转录反应试剂 (RT Reagents) 组成。



< Lysis Reagents >



< RT Reagents >



产品内容:

< SCQ-401 >

(Lysis Reagents)	
Lysis Solution	6.5ml
gDNA Remover	33μl
RNase Inhibitor	110μl

(RT Reagents)

5 x RT Master Mix	860μl
5 x RT Mastre Mix no-RT control	86μl
Nuclease free Water	1.7ml × 2

< SCQ-501 >

Lysis Solution	6.5ml
gDNA Remover	33μl
RNase Inhibitor	110μl

保存:

-20°C

→ 特征

① 无需纯化 RNA

可简便地从培养细胞开始制备能用作逆转录反应模板的含有 RNA 的细胞裂解液。以 Lysis Solution 处理的裂解液为模板, 可直接进行逆转录反应, 因此可以大幅度缩短分析时间。

② 从裂解液开始合成高品质的 cDNA

通过 Buffer 组分的最优化, 有效抑制了因 RNase 等细胞成分引起的 RNA 降解 (配制好的 RNA 可以在冰上稳定放置 6 小时)。另外, 由于 DNase I 处理后才进行 cDNA 的合成, 所以可以合成基因组 DNA 污染很少的高品质 cDNA。逆转录试剂是以本公司的高效逆转录酶 [ReverTra Ace] 为基础且优化过的 Master Mix, 能够简便、高效地合成 cDNA。合成的 cDNA 可长期保存。

3 可用于多种类型的哺乳类动物细胞

SuperPrep[®] II 在提高了细胞裂解性能的同时,也降低了 RNase 的影响。与上一代产品 SCQ-101 相比,可使用更多种类的细胞进行分析。已确认适用于本产品的细胞种类如下表。

表 1. *SuperPrep*[®] II 已确认适用的细胞

细胞名	贴壁/悬浮	菌种	细胞	来源
1 HPA	贴壁	H.sapiens	preadipocytes (primary cell)	前体脂肪细胞
2 HEK	贴壁	H.sapiens	epidermal keratinocytes (primary cell)	表皮角质化细胞
3 HA	贴壁	H.sapiens	astrocytes (primary cell)	星形胶质细胞
4 HDF	贴壁	H.sapiens	dermal fibroblasts (primary cell)	皮肤纤维芽细胞
5 HFLS	贴壁	H.sapiens	fibroblast-like synoviocytes (primary cell)	成纤维样滑膜细胞
6 HBEPc	贴壁	H.sapiens	bronchial epithelial cells (primary cell)	支气管上皮细胞
7 HUVEC	贴壁	H.sapiens	umbilical vein endothelial cells (primary cell)	脐静脉内皮细胞
8 HPAEC	贴壁	H.sapiens	pulmonary artery endothelial cells (primary cell)	脐动脉内皮细胞
9 HC	贴壁	H.sapiens	chondrocytes (primary cell)	软骨细胞
10 HOb	贴壁	H.sapiens	osteoblasts (primary cell)	成骨细胞
11 HSkMC	贴壁	H.sapiens	skeletal muscle cells (primary cell)	骨骼肌细胞
12 HAOSMC	贴壁	H.sapiens	Aortic smooth muscle cells (primary cell)	主动脉平滑肌细胞
13 HFDPC	贴壁	H.sapiens	hair follicle dermal papilla Cells (primary cell)	人毛乳头细胞
14 HMSC	贴壁	H.sapiens	marrow stromal cell (primary cell)	骨髓间质细胞
15 A431	贴壁	H.sapiens	epidermoid carcinoma cell line	表皮癌细胞系
16 HeLa S3	贴壁	H.sapiens	cervix carcinoma cell line	宫颈癌细胞系
17 HepG2	贴壁	H.sapiens	hepatocellular carcinoma cell line	肝癌细胞系
18 C2C12	贴壁	M. musculus	myoblast cell line	成肌细胞
19 NIH-3T3	贴壁	M. musculus	embryo fibroblast cell line	胚胎纤维母细胞
20 MDCK	贴壁	C. familiaris	kidney cell line	肾脏细胞
21 CHO-K1	贴壁	C. griseus	ovary cell line	卵巢细胞系
22 Jurkat	悬浮	H.sapiens	T lymphocyte cell line	T淋巴细胞系
23 K562	悬浮	H.sapiens	myelogenous leukemia cell line	粒细胞白血病细胞系
24 THP-1	悬浮	H.sapiens	acute monocytic leukemia cell line	急性单核细胞白血病细胞系
25 U937	悬浮	H.sapiens	leukemic monocytic lymphoma cell line	核细胞白血病淋巴瘤细胞系
26 HMNC	悬浮	H.sapiens	mononuclear cells (primary cell)	单核细胞

基本反应条件:

< 裂解液的配制 >

按以下比例 (1 次反应量) 向 Lysis Solution 中添加 RNase Inhibitor 以及 gDNA Remover

Lysis Solution	58.7 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l
gDNA Remover	0.3 μ l

↓

向已加入细胞的各孔中添加 Lysis Solution (含 RNase Inhibitor 以及 gDNA Remover) 60 μ l

↓

振荡 30 秒后, 室温温育 4 分 30 秒

↓

置于冰上

< 逆转录 (RT) 反应 >

按以下比例 (1 次反应量) 在冰上配制

RT Master Mix	
5 \times RT Master Mix	8 μ l
Nuclease-free Water	24 μ l

↓

每管分装 32 μ l

↓

添加裂解液 8 μ l

↓

37°C, 15min.

50°C, 5min.

98°C, 5min. (酶失活)

4°C, Hold

4 降低了高通量分析误差

操作步骤上因为减少了少量分装操作及稀释操作,降低了高通量分析时的误差。另外,没有细胞裂解时的吹打混匀操作,而且进行了 gDNA Remover 处理,提高了操作性。无需反应停止液的添加,也无需引起 RNA 不稳定的加热操作。

5 可以与各种荧光定量 PCR 试剂组合使用

可与各种荧光定量 PCR 试剂组合使用 (SYBR[®] Green I、TaqMan[®] Assay 均可使用)。另外,通过与本公司的 THUNDERBIRD[®] Probe qPCR Mix (Code No. QPS-101)、KOD SYBR[®] qPCR Mix (Code No. QKD-201) 组合使用,可以确认能够从培养细胞开始简便且高精度地进行基因表达分析。此外,与本公司的 THUNDERBIRD[®] Probe One-step qRT-PCR Kit (Code No. QRZ-101)、*RNA-direct*[™] SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix (Code No. QRT-201) 等一步法荧光定量 PCR 试剂组合使用,也可进行简易分析。

→ 用途: Realtime PCR 用的 cDNA 合成

→ 说明

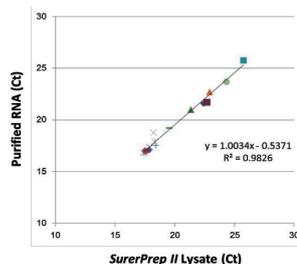
SuperPrep[®] II Cell Lysis & RT Kit for qPCR 是由通过荧光定量 PCR 对基因表达进行分析用的细胞裂解试剂 (Lysis Reagents) 与逆转录反应试剂 (RT Reagents) 组成的试剂盒。使用本产品,可以从用 96 孔板等培养的细胞开始,简便地配制含有可作为逆转录反应模板用 RNA 的细胞裂解液。另外,本试剂盒中含有的逆转录反应 (RT) 试剂,最适用于从细胞裂解液开始直接逆转录反应。使用本试剂盒,可以简便、迅速地培养细胞开始直接合成荧光定量 PCR 用的模板 cDNA,可用于高通量分析。

SuperPrep[®] II Cell Lysis Kit for qPCR 是细胞裂解试剂 (Lysis Reagents) 的单独销售品。也可用于配制一步法荧光定量 RT-PCR 用的细胞裂解液。

→ 说明

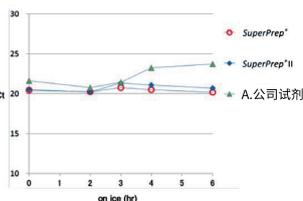
① 纯化过的 RNA 与用细胞裂解液的 Ct 相关性验证

使用 *SuperPrep*® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code No. SCQ-401), 从 2.5×10^4 个 HUVEC 细胞开始合成 cDNA (40 μ l 反应体系)。另外, 从 HUVEC 细胞抽提的 Total RNA 66.6ng 开始, 用 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (Code No. FSQ-201), 进行 cDNA 的合成 (40 μ l 反应体系)。之后, 以各自的 cDNA 为模板, 使用 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201), 对 15 种管家基因进行荧光定量 PCR, 检验得到的 Ct 值的相关性。结果表明, 本次分析的 15 种基因, 纯化 RNA 与使用细胞裂解液分析得到的结果具有良好的相关性



② 细胞裂解液在冰上稳定性的确认

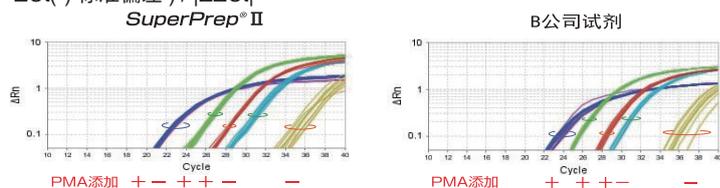
使用 *SuperPrep*® II Cell Lysis Kit for qPCR (Code No. SCQ-401), 将 4×10^4 个 HeLa S3 细胞制成细胞裂解液, 放置于冰上后, 0~6 小时后进行细胞裂解液的取样, 随即进行 cDNA 合成。同样使用本公司以前的产品 (*SuperPrep*®) 及 A 公司试剂, 制备细胞裂解液, 同样地进行取样, 进行 cDNA 合成。以合成的 cDNA 为模板, 使用 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code No. QPS-101), 进行荧光定量 PCR 对 GAPDH 基因的表达量进行分析。结果表明, HeLa S3 细胞即使在冰上放置 6 个小时, 也没有观察到显著的 Ct 值的延迟。



③ 将数据的误差考虑在内进行分析体系的质量评价

将 HeLa S3 细胞接种到 96 孔板中, 每孔加入 2×10^4 个细胞, 加 100nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 培养 24 小时, 用 PBS(-) 洗涤 PMA 处理过的及未处理的各 12 个孔的细胞, 用 *SuperPrep*® II Cell Lysis Kit for qPCR (Code No. SCQ-401) 处理后进行 cDNA 的合成。得到 cDNA 以后, 使用 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code No. QPS-101), 对 IL-6、IL-1 β 、 β -actin 基因进行 TaqMan® 探针分析 (按 n=12 进行实验)。同样, 使用 B 公司的同类产品进行 qPCR (逆转录与 qPCR 试剂也用 B 公司试剂盒中附带的产品)。IL-6、IL-1 β 基因的 Ct 用 β -actin 基因进行校正 (Δ Ct), 计算有无 PMA 处理的差异 ($\Delta\Delta$ Ct)。最后计算出 Z'-factor 并进行比较。

Z'-factor: 是将数据的误差考虑在内, 以高通量分析体系质量标准的数值。通常认为 0.5 以上是良好的结果。计算公式如下: $Z'\text{-factor} = 1 - 3 \times (\Delta\text{Ct}(+) \text{ 标准偏差} + \Delta\text{Ct}(-) \text{ 标准偏差}) / |\Delta\Delta\text{Ct}|$



IL-1 β	PMA	Ct (IL-1 β)		Δ Ct (IL-1 β - β -actin)		$\Delta\Delta$ Ct	Z'
		平均值	标准差	平均值	标准差		
SuperPrep®II	(+)	27.83	5.93	0.18		-6.81	0.66
	(-)	34.85	12.75	0.59			
B公司试剂	(+)	28.42	5.01	0.28		-7.38	0.59
	(-)	35.98	12.39	0.74			

IL-6	PMA	Ct (IL-6)		Δ Ct (IL-6- β -actin)		$\Delta\Delta$ Ct	Z'
		平均值	标准差	平均值	标准差		
SuperPrep®II	(+)	25.35	3.45	0.20		-4.05	0.66
	(-)	29.60	7.50	0.26			
B公司试剂	(+)	25.64	2.24	0.19		-3.94	0.64
	(-)	29.76	6.18	0.29			

结果表明: 虽然两种试剂得到的 Z'-factor 都超过了良好分析体系的标准, 但是使用本公司的 *SuperPrep*® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Code: SCQ-401) 搭配 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (Code: QPS-101) 试剂时, 比其他公司的试剂得到了更高的 Z'-factor, 可见是相对质量更高的分析体系。

→ 相关产品

① 高效率 1-step qRT-PCR Kit

THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit	QRZ-101	100 次份	¥2,400	→ 1-8 页
RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix 系列	-	-	-	→ 1-12 页

最适用于 Realtime PCR 用 cDNA 合成的预混型逆转录试剂。

Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒 完全预混型

ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix 系列

ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix

Code: FSQ-201 200次份 ¥ 2,000

ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA

Remover(含去除基因组 DNA 的组分)

Code: FSQ-301 200次份 ¥ 2,800

ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix 系列是使用高效率逆转录酶 ReverTra Ace[®] (→ 3-14 页) 开发的 Realtime PCR 用的逆转录反应试剂盒。将以往的 ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Code No. FSQ-101) 完全预混之后的产品是 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (Code No. FSQ-201),



在此基础上,为了简便地配制不含基因组 DNA 的 cDNA, 添加了能强力分解 DNA 的 gDNA Remover 的组分, 该产品为 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No. FSQ-301)。

产品内容:

<FSQ-201>

5×RT Master Mix 400 μl × 1 支
5×RT Master Mix no-RT Control 40 μl × 1 支
Nuclease-free Water 1000 μl × 2 支

<FSQ-301>

gDNA Remover 10 μl × 1 支
4×DN Master Mix 440 μl × 1 支
5×RT Master Mix II 400 μl × 1 支
5×RT Master Mix II no-RT Control 40 μl × 1 支
Nuclease-free Water 1000 μl × 2 支

※10 μl 反应体系情况下, 各可以使用 200 次。

保存:

-20°C

→ 特征

① 完全预混型试剂

本产品为完全预混型试剂, 放置于 -20°C 也不会冻结。只要添加模板 RNA 与水, 就可以简便高效率地合成 cDNA, 且重复性良好。

② 容易配制逆转录反应 (-) 对照

因为添附有预混型 no-RT 对照, 能够方便地配制逆转录反应 (-) 对照。

③ 可得到更广的可定量扩增区域

将 Oligo dT 与 Random Primer 按最适比例预混, 可均一、高效地在 RNA 全序列范围内进行逆转录反应, 因此可得到更广的可定量扩增区域。

④ 与 Realtime PCR 试剂的配合性良好

采用了对 Realtime PCR 反应体系影响最小的组分, 即使在 PCR 中添加最多 20% 的逆转录反应液, 也可以得到很高的直线相关性。最适用于表达量少的 mRNA 的高灵敏度检测。

⑤ 简便、迅速地去除基因组 DNA

只要依次添加去除基因组 DNA 的试剂和逆转录反应试剂, 约 20 分钟就可以配制不含基因组 DNA 的 cDNA。【ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No. FSQ-301)】

→ 用途: Realtime PCR 用 cDNA 的合成

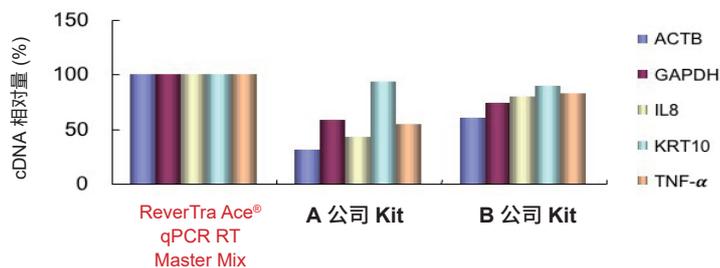
→ 说明

ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (Code No. FSQ-201) 是使用高效率逆转录酶 ReverTra Ace[®] (→ 3-14 页) 开发的 Realtime PCR 用的逆转录反应试剂盒, 是含有逆转录反应必需的全部组分的 5× 浓度的完全预混型试剂, 只要添加模板 RNA 与水, 就能迅速地开始反应。另外, 通过优化组分, 适用于作为 Realtime PCR 目的基因的短链 cDNA 的合成, 因此可以在短时间内高效率地配制适用于 Realtime PCR 的 cDNA。

ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No. FSQ-301) 中添附有能强力分解 DNA 的 gDNA Remover, 在逆转录反应前对模板 RNA 进行处理, 就可以简便地配制无基因组 DNA 的 cDNA。最适用于待检测目的基因中存在假基因, 或在跨越内含子位置不能设计引物, 以及模板 RNA 中残存有基因组 DNA 污染等问题时的 Realtime PCR 实验。

→ 结果示例

① 与其他公司预混型 cDNA 合成试剂的逆转录反应效率 (cDNA 合成量) 比较
以 HeLa total RNA 100ng 为模板, 按各公司试剂盒的推荐条件进行逆转录反应, 接着用 Realtime PCR 对 5 种目的基因进行定量。结果显示, 用本试剂盒可以得到最高的得量。



(1) cDNA 合成

试剂: ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (Code No. FSQ-201) 及其他公司同类型 (预混型) 产品
模板: HeLa total RNA 100ng/10 μl 反应体系
条件: 根据各公司试剂盒推荐的条件进行

(2) Realtime PCR

试剂: THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201)
模板: 上述 cDNA 2 μl/20 μl 反应体系 (添加量 10%)
Target: 代表基因 5 种
仪器: Applied Biosystems 7900HT

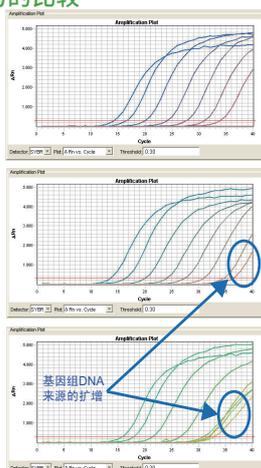
② 与其他公司同类型产品基因组 DNA 去除能力的比较

在 HeLa total RNA 中添加过量的人基因组 DNA, 与其他公司同类型试剂盒进行基因组 DNA 去除能力的比较模拟实验。结果显示, ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 在基因组 DNA 去除方面效果更加显著。

ReverTra Ace®
qPCR RT
Master Mix with
gDNA Remover

A 公司 Kit

C 公司 Kit



(1) cDNA 合成

试剂: ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code No. FSQ-301) 及其他公司同类型试剂盒 2 种
模板: HeLa total RNA (0.1pg, 10pg, 100pg, 1ng, 10ng, 100ng, 1 μg)+ 人 gDNA 100ng/20 μl 反应体系
条件: 根据各公司试剂盒推荐的条件进行

(2) Realtime PCR

试剂: THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Code No. QPS-201)
模板: 上述 cDNA 2 μl /20 μl 反应体系 (添加量 10%)
Target: ACTB(188bp)
仪器: Applied Biosystems 7900HT

基本反应条件:

<FSQ-201>

<RNA 变性>

将 RNA 置于 65°C, 5min.

↓

置于冰上

<cDNA 的合成>

Nuclease-free Water	X μl
5 × RT Master Mix	2 μl
RNA template	1pg~1 μg
Total volume	10 μl

↓

37°C, 15min.

98°C, 5min.

4°C, hold

<FSQ-301>

<RNA 变性>

将 RNA 置于 65°C, 5min.

↓

置于冰上

<gDNA 去除反应 (DNase) >

Nuclease-free Water	X μl
4 × DN Master Mix (已添加 gDNA Remover)	2 μl
RNA template	0.5pg~0.5 μg
Total volume	8 μl

↓

37°C, 5min.

(4°C)

<cDNA 的合成>

上述反应液	8 μl
5 × RT Master Mix II	2 μl
Total volume	10 μl

↓

37°C, 15min.

98°C, 5min.

4°C, hold

→ 相关产品

① 高效率 Realtime PCR Master Mix

THUNDERBIRD® qPCR Mix 系列	-	-	-	→ 1-19 页
Realtime PCR Master Mix 系列	-	-	-	→ 1-21 页
KOD SYBR® qPCR Mix	QKD-201	1.67ml×3 支	¥2,450	→ 1-13 页

② 高效率逆转录酶

ReverTra Ace®	TRT-101	10,000U	¥800	→ 3-14 页
---------------	---------	---------	------	----------

经过最优化的最适用于合成 Realtime PCR 用 cDNA 的逆转录试剂盒全新登场!

Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒

ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit

Code: FSQ-101 200次份 × 1 ¥ 1,500

最适于 Realtime PCR 用模板 cDNA 合成的简便、高效率的逆转录试剂盒。



产品内容:

<FSQ-101>	
5×RT Buffer*	400 μl
Enzyme Mix	100 μl
Primer Mix	100 μl
Nuclease-free Water	1ml × 2支

*5×RT 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。

保存:

-20°C

参考文献:

1) M.Hatta et al., *Intl.J.Mol.Med.*, 9:147-152(2002)

基本反应条件:

<RNA 的变性>*

将 RNA 在 65°C 下变性 5min.

↓

迅速置于冰上

* 此步处理对于容易形成复杂高级结构的 RNA 可以提高逆转录的效率。

<cDNA 的合成>

灭菌蒸馏水	X μl
5×RT Buffer	2 μl
RT Enzyme Mix	0.5 μl
Primer Mix	0.5 μl
RNA	0.5pg~1 μg
Total volume	10 μl

↓

37°C, 15min.

98°C, 5min.

→ 特征

① 超群的 cDNA 合成效率

通过 mix primer(Oligo dT 和 Random primer) 的最优化及 Buffer 的改良, 可实现高效率的逆转录反应。

② 短时间·简单的实验步骤

逆转录反应仅需 15 分钟即可完成。即便是要去除对 Realtime PCR 反应有抑制的残留的模板 RNA, 也无须追加 RNase H 处理。

③ 提高了与 Realtime PCR 试剂的适用性

通过改良, 使带入到 Realtime PCR 反应体系的逆转录反应液的影响降到最小。

→ 用途: Realtime PCR 用 cDNA 的合成

→ 说明

本试剂盒由于使用了高效率逆转录酶「ReverTra Ace[®](→ 3-14 页)」, 具有非常出色的反应效率。另外, 为了使带入到 Realtime PCR 反应体系中的逆转录反应液的影响降低到最小, 本产品对组成成分进行了改良。即便带入最大 20%(V/V) 的液量, 也能显示良好的扩增线性。因此, 最适合用于检测低拷贝 mRNA。除此之外, 由于精简了试剂盒的构成, 可非常简便地进行操作。

→ 结果示例

① 与其他公司产品的 cDNA 合成量比较

以来源于 HeLa 细胞的 total RNA 100ng 为模板, 根据各公司试剂盒的推荐条件进行逆转录反应。在 Realtime PCR 反应液 [本公司 SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix (→ 1-12 页)] 中分别加入上述的逆转录反应液各 1%(V/V), 用 Realtime PCR 对 β-Actin 和 Polymerase ε 的 cDNA 量进行定量。结果可见, 在使用本试剂盒的情况下, 两个目的片段都有最高的检测灵敏度。

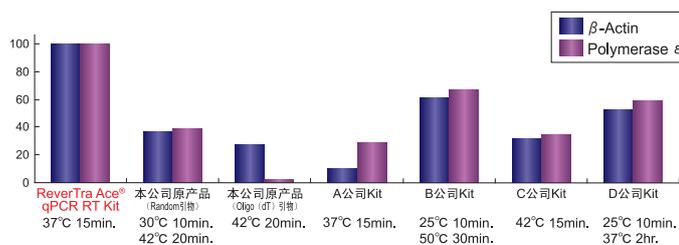
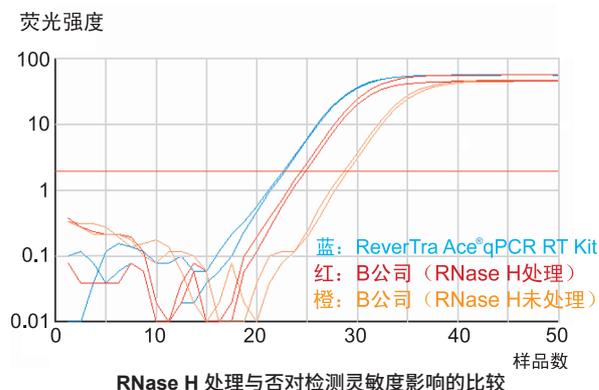


图 1. cDNA 合成量比较
图下的数值为逆转录反应的温度与时间

② RNaseH 处理与否对检测灵敏度影响的比较

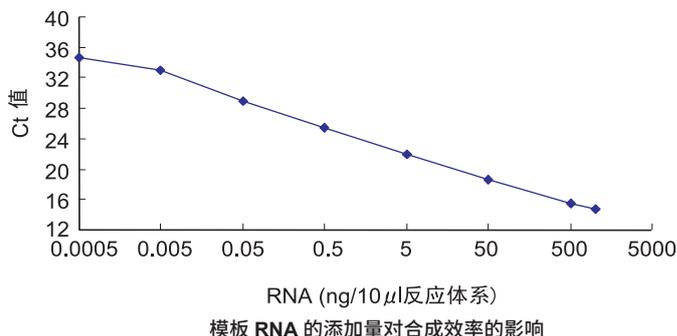
以来源于 HeLa 细胞的 total RNA 100ng 为模板，使用本试剂盒及另外添附 RNaseH 的 B 公司试剂盒，按各自推荐的实验步骤进行逆转录反应（B 公司试剂盒分别按 RNaseH 处理和未处理两种方法进行）。然后，按和结果示例 1 同样的方法检测 β -Actin 的扩增效果。结果显示，用 B 公司的试剂盒 (RNaseH 未处理)，检测效果大幅下降，而用本试剂盒进行反应，即便不追加 RNaseH 处理也能显示出很高的扩增效率。已经过实验证明，用本试剂盒 RNaseH 处理与否灵敏度相等。

※ 本试剂盒不包含 RNaseH 处理步骤。



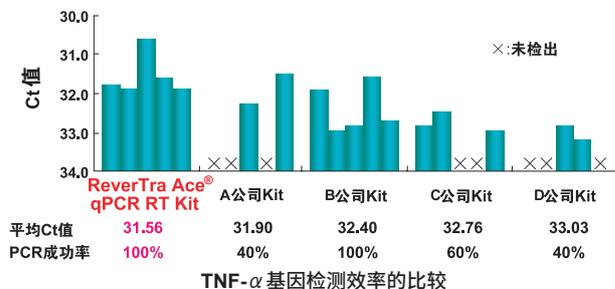
③ 模板 RNA 的添加量对合成效率影响的探讨

在 ReverTra Ace® qPCR RT Kit 10 μ l 反应体系中，分别添加 0.5 μ g~0.5pg 的 HeLa total RNA，采用和结果示例 2 同样的方法进行 cDNA 的合成并比较。结果可见，在探讨的范围内，模板 RNA 的量和 cDNA 的得率密切相关，但无论模板 RNA 量的多寡，仍可维持很高 cDNA 合成效率。由此可见，在目标片段浓度有差异的样品之间，逆转录反应效率的变化并不大，因此可将定量结果的误差控制在最小范围内。



④ 低表达量基因检测效率的比较

对 HeLa 细胞系的低表达量 TNF- α 基因的检测效率进行比较。用各公司的试剂盒，对来源于 HeLa 细胞的 Total RNA 100ng 进行逆转录，然后将其添加到 Realtime PCR 反应液 [使用本公司的 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix] 中，使其达到约 2%，做 5 个重复，对 Ct 值和 PCR 成功率进行比较。结果可见，虽然由于 TNF- α 的表达量很低，所有反应的 Ct 值均超过了 30，但使用本试剂盒，Ct 值更低更好，且 PCR 的成功率为 100%。而使用其他公司的试剂盒，存在 Ct 值高而 PCR 成功率低的倾向。



→ 相关产品

① 高效率 Realtime PCR Master Mix

THUNDERBIRD® qPCR Mix 系列	-	-	-	→ 1-19 页
Realtime PCR Master Mix 系列	-	-	-	→ 1-21 页
KOD SYBR® qPCR Mix	QKD-201	1.67ml×3 支	¥2,450	→ 1-13 页

使用改良型 M-MLV 逆转录酶的高效率 cDNA 合成试剂盒。

高效率 cDNA 合成试剂盒

ReverTra Ace - α -[®]

Code: FSK-101 100次份 × 1 ¥ 1,950

本试剂盒为使用高效率逆转录酶「ReverTra Ace[®](→ 3-14 页)」的高效率 cDNA 合成试剂盒。

→ 特征

① 高效率

本试剂盒使用高效率逆转录酶「ReverTra Ace[®](→ 3-14 页)」, 可进行高效率的 cDNA 合成。

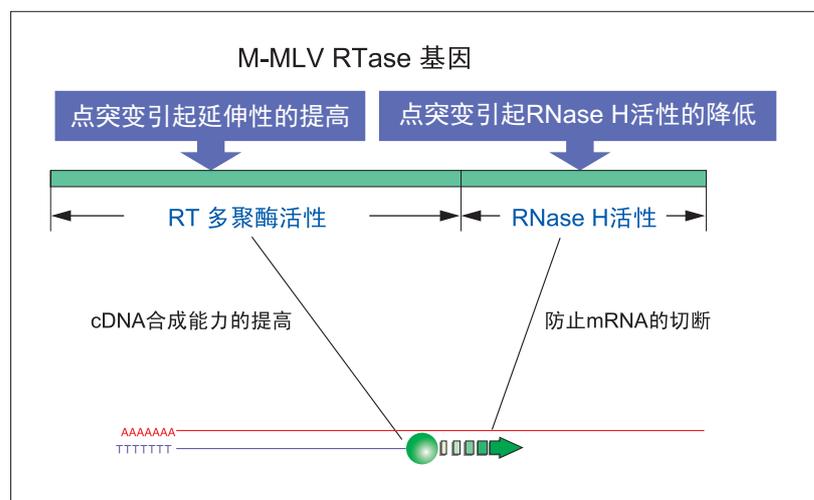
② 广泛的应用范围

可用于使用 Random Primer、Oligo dT Primer、及 Specific Primer 的逆转录反应中。

→ 用途: RT-PCR 用 cDNA 的合成

→ 说明

本试剂盒使用的逆转录酶 ReverTra Ace[®] 属于在高温反应性和反应效率方面进行了提高的改良型 M-MLV RTase(RNaseH⁻), 与以往的 RTase 相比, 可以合成更长的 cDNA(已确认到可以合成 cDNA 长度最长可达 14kb)。



→ 几点建议

① 模板 RNA

Total RNA、mRNA、tRNA、rRNA 均可用作模板 RNA。不论采用哪种模板, 如果采用高纯度的样品, 则均可获得较好的实验效果。

② 对照组

建议在样品首次进行的 RT-PCR 反应时同时加入对照组。该试剂的对照专用的 G3PDH 引物适用于 Human、Mouse、Rat、Swine, 可产生 0.45kb 的 PCR 产物。

产品内容:

ReverTra Ace [®] (10U/ μ l)	100 μ l
5 \times RT Buffer*	400 μ l
Random Primer	100 μ l
Oligo(dT) ₂₀ Primer	100 μ l
10mM dNTPs	200 μ l
RNase Inhibitor	100 μ l
RNase Free H ₂ O	1.2ml

*5 \times RT Buffer 与 ReverTra Ace 用 Buffer 组分相同。5 \times RT Buffer 在溶解时, 可能会出现白色沉淀现象, 但不影响其品质。此时, 请使用振荡器等仪器使其混合均匀, 等完全溶解后再使用。

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C

参考文献:

1) M.Hatta et al., *Intl.J.Mol.Med.*,
9: 147-152(2002)

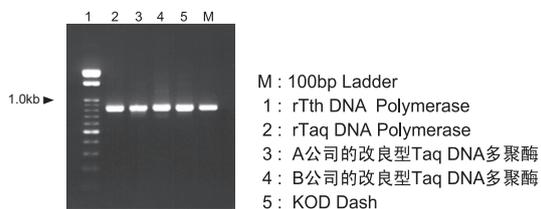
→ 结果示例

① 用于 PCR 反应的酶的比较

采用 ReverTra Ace- α -[®] 以 HeLa Total RNA(1 μ g) 为模板, 在进行 1st strand cDNA 合成反应后, 采用各种 PCR 酶, 以 β -actin(838bp) 为目的片段进行 PCR 反应。

1st strand cDNA 合成反应在 20 μ l 的溶液中 42°C 下反应 20min., 在 99°C 下进行 5min. 的失活。然后, 使用全量的 cDNA 合成反应液, 在 100 μ l 的溶液用 2.5U 的 PCR 专用酶进行 PCR 反应。

结果显示, ReverTra Ace- α -[®] 的反应产物可适用于各种 DNA 多聚酶的 PCR 反应。



基本反应条件:

<cDNA 合成>	
灭菌蒸馏水	X μ l
模板 RNA	
Total RNA	100-1000ng
mRNA	10-100ng
引物	
Oligo(dT) ₂₀	1 μ l
Random	1 μ l
Gene Specific	10pmoles*
5 \times RT Buffer	4 μ l
10mM dNTPs	2 μ l
ReverTra Ace [®]	1 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l
Total Volume	20 μ l

* 该引物与 PCR 3' 引物(与 anti-sense 链具有相同的序列)相同

30°C	10min.*
42°C	20min.
99°C	5min.

* 该步骤仅在使用随机引物时才需要。

→ 相关产品

① RT 反应用的引物

10mM dNTPs Mixture	NTP-301	0.2ml \times 1 支	¥200	→ 2-39 页
Oligo(dT) ₂₀	FSK-201	1nmole	¥200	→ 3-13 页
Random Primer(9mer)	FSK-301	2.5nmoles	¥200	→ 3-13 页

② 高效率逆转录酶

ReverTra Ace [®]	TRT-101	10,000U	¥800	→ 3-14 页
---------------------------	---------	---------	------	----------

③ Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒

ReverTra Ace [®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	FSQ-301	200 次份	¥2,800	→ 3-8 页
ReverTra Ace [®] qPCR RT Master Mix	FSQ-201	200 次份	¥2,000	→ 3-8 页
ReverTra Ace [®] qPCR RT Kit	FSQ-101	200 次份	¥1,500	→ 3-10 页

④ RNase Inhibitor

RNase Inhibitor Recombinant type	SIN-201	25,000U	¥300	→ 3-16 页
----------------------------------	---------	---------	------	----------

对 M-MLV RTase 进行了改良。提高了延伸性、反应效率及高温反应性。

高效率逆转录酶

ReverTra Ace[®]

Code: TRT-101 10,000U × 1支 ¥800

本酶是对 M-MLV 逆转录酶改良后的高效率逆转录酶。提高了延伸性、反应效率及高温反应性。

→ 特征

① 提高了延伸性

在 M-MLV RTase 的 RNaseH 活性区域内导入了点突变、去除了 RNaseH 活性，延伸性有了明显的提高。

② 提高了反应效率和高温反应性

在 M-MLV RTase 的 DNA 合成区域中导入了点突变，及改良了反应组成，提高了反应效率和高温反应性。

③ 最适合于 RT-PCR

适合更多种 RT 反应，尤其适用于 RT-PCR。

→ 用途：第一链 cDNA 的合成

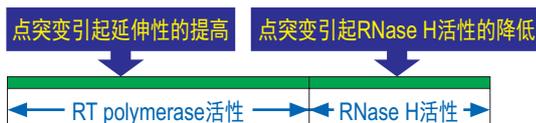
→ 说明

RNaseH 活性在 cDNA 合成中，会分解作为模板 / 引物的 DNA-RNA 杂交体中的 RNA，导致反应效率的下降。

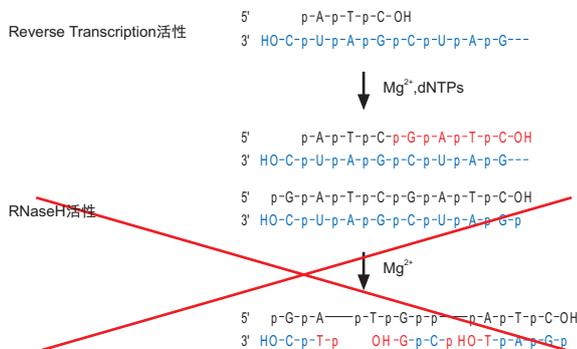
ReverTra Ace[®] 在 M-MLV(Moloney Murine Leukemia Virus)RTase 基因的 RNaseH 活性区域和 DNA 合成区域中导入了本公司独特的点突变，在改变了酶机能的同时，对缓冲液也进行了最优化，实现了更好的高温反应性、延伸性和反应效率。

另外，RNA 的高级结构也阻碍了 RTase 反应的正常进行，给 cDNA 合成带来了困难。由于提高了 RTase 的高温反应性，故可通过提高反应温度而缓和模板 RNA 的高级结构，以促进 RTase 对 cDNA 的合成反应。

本酶具有比 deletion 型 M-MLV RTase 高 4 倍的比活，可进行高效率的 RT-PCR 反应。



→ 原理



→ 几点建议

① 反应温度

本酶通常在 42°C 下进行反应。为了缓和 RNA 高级结构的影响而需提高反应温度时，须注意引物的结合效率。使用随机引物时，请先在 25-30°C 下温育 10 分钟后再开始反应。

产品内容:

<TRT-101>
 ReverTra Ace[®](100U/μl) 100 μl
 5×Buffer* 1ml

*5×Buffer 中不包含 dNTPs(参照相关产品)。5×RT Buffer 在溶解时，可能会出现白色沉淀现象，但不影响其品质。此时，请使用振荡器等仪器使其混合均匀，等完全溶解后再使用。

组成:

50mM	Tris-HCl(pH7.5)
100mM	NaCl
0.1mM	EDTA
10mM	DTT
0.01%	Nonidet P-40
50%	Glycerol

活性的定义:

以 Poly(rA): Oligo(dT)₂₀ 为模板/引物，在 42°C 下，10 分钟内摄入 1nmole 的 dTTP 使成为酸不溶性沉淀物时所需的酶量为 1U。

来源:

E. coli 重组体

保存条件:

-20°C

纯度:

50U 的本酶和 0.2 μg 的 MS2 RNA 在 42°C 下反应 1 小时，RNA 电泳模式未见变化。

参考文献:

- 1) K.Miyazaki et al., *J.Bacteriology.*, **185**: 2219-2226(2003)
- 2) A.Nezu et al., *Biochem.J.*, **263**: 59-66(2002)
- 3) S.Nakamura et al., *J.Biochem. (Tokyo)*, **131**: 241-246(2002)
- 4) S.Atsumi et al., *EMBO J.*, **20**: 5453-5460(2001)
- 5) Y.Yabuta et al., *Plant Cell Physiol.*, **41**: 666-675(2000)
- 6) S.Lee et al., *Gene*, **245**: 253-266(2000)

商品使用文献:

- 1) T.Ikeda et al., *Endocrinology* **142** (4):1419-1426.(2001)
- 2) S.Ohuchi et al., *Nucleic Acids Research*, **30**(15):3473-3480(2002)
- 3) K.Minami et al., *Toxicological Sciences*, **87**(1): 296-305(2005)



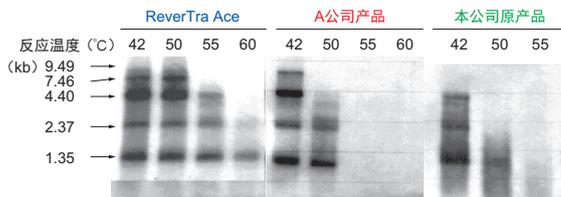
② mRNA 的热变性

为了缓和高级结构, 须先让 mRNA 发生热变性(65°C, 5 分钟, 立即置于冰上)预处理后再进行反应, 这样反应效率可能会有所提高。此时在热变性处理后再加入本酶。

→ 结果示例

① 在 42~60°C 时的 cDNA 合成反应

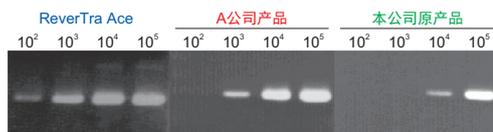
100U 的本酶同带有 poly(A)Tail 的 RNA 模板 0.4 μg 长度分别为 9.49、7.46、4.40、2.37、1.35kb 及 25pmoles 引物 [Oligo(dT)₂₀], 在 42~60°C 下进行 30min. 的 cDNA 合成反应。结果显示, 在 42°C 及 50°C 时生成了 9.49kb, 55°C 生成了 4.4kb, 60°C 时生成了 2.37kb 的 cDNA 合成产物。



② cDNA 合成效率的比较

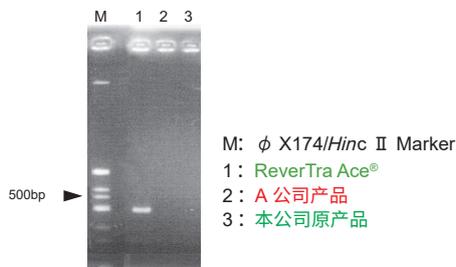
以在 *in vitro* 条件下合成的 G3PDH 的 RNA 10²~10⁵ copies 为模板, 使用 G3PDH 的下游引物, 在 42°C 下进行 20min. 的 cDNA 合成反应。然后, 再加入 G3PDH 上游引物, 用 rTaq DNA Polymerase(Code No. TAP-201) 进行 PCR 反应。

结果可见, 用 ReverTra Ace®, 即便是以 10² copies 的 RNA 为模板, 也可确认到扩增产物。



③ 14kb cDNA 合成反应

制备针对 dystrophin mRNA 3' 末端的特异性 cDNA 合成引物, 并以人类骨骼肌 poly(A)⁺ RNA 为模板, 在 42°C 下, 反应 30min., 然后加入对 mRNA 5' 末端特异 PCR 引物组 (位于 cDNA 合成引物上游 14kb 处), 用 KOD Dash(Code No. LDP-101) 进行 PCR 实验。结果显示, 使用 ReverTra Ace®, 可合成 14kb 以上的 cDNA。



基本反应条件:

<RT-PCR 用 cDNA 合成 >	
灭菌蒸馏水	X μl
模板 RNA	
total RNA	100-1000ng
poly(A) ⁺ RNA	50-500ng
Primer	
Oligo(dT) ₂₀	5pmoles
Random	25pmoles
Gene Specific	5pmoles
5×Buffer	4 μl
10mM dNTPs	2 μl(1mM)
ReverTra Ace®(100U/ μl)	1 μl(100U)
RNase Inhibitor	1 μl
Total Volume	20 μl

30°C	10min.*
42°C	20~60min.
99°C	5min.

* 该步骤只在使用随机引物时才需要。

<1st strand DNA 合成 >	
灭菌蒸馏水	X μl
poly(A) ⁺ RNA	0.4 μg
Oligo(dT) ₂₀	25pmoles
5×Buffer	4 μl
10mM dNTPs	2 μl(1mM)
ReverTra Ace®(100U/ μl)	1 μl(100U)
RNase Inhibitor	20U
Total Volume	20 μl

42°C	30min.
99°C	5min.

→ 相关产品

① RT 反应用的引物

Oligo(dT) ₂₀	FSK-201	1nmole	¥200	→ 3-13 页
Random Primer(9mer)	FSK-301	2.5nmoles	¥200	→ 3-13 页

② dNTPs

dNTPs Mixture(10mM)	NTP-301	各 2 μ moles	¥200	→ 2-39 页
---------------------	---------	-------------	------	----------

③ RNase Inhibitor

RNase Inhibitor Recombinant type	SIN-201	25,000U	¥300	→ 3-16 页
----------------------------------	---------	---------	------	----------

④ 高效率 cDNA 合成试剂盒

ReverTra Ace -α [®]	FSK-101	100 次份	¥1,950	→ 3-12 页
------------------------------	---------	--------	--------	----------

与 RNase A 结合抑制 RNase 的活性。最适用于 RT-PCR。

RNase Inhibitor

Recombinant type Code: SIN-201 2,500U × 1支 ¥300

<工业包装请询价>

本酶是针对 Ribonuclease A(RNase A) 蛋白质性的抑制剂。逆转录反应时使 RNA 保持稳定。

→ 特征

- ① 在较广的 PH 值范围内保持活性
在 DTT 存在下, 可在 PH 5~8 的环境下使用。

→ 用途

- ① 在 cDNA 的合成及 *in vitro* 翻译等使用 RNA 的实验中使 RNA 保持稳定
② 在 RNA 探针的制备及 *in vitro* 翻译等产生 RNA 的实验中使 RNA 保持稳定

→ 说明

本酶是人胎盘来源的、分子量为 51kDa 的重组蛋白, 与 RNaseA 以 1: 1 的比例形成复合物, 对 RNase 的活性表现出可逆非拮抗性抑制作用。
特别在 RT-PCR 中的 RTase 反应时添加本产品, 可以得到稳定的 RT-PCR 结果。

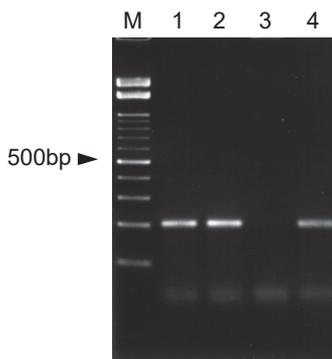
→ 结果示例

① RNase Inhibitor 在 RT-PCR 反应中的效果

使用 MagExtractor™ -RNA-(Code No. NPK-201F) 从 HL60 细胞提取 RNA 来进行 RT-PCR。

分别在加入和不加入 RNase A 的条件下, 用随机引物进行 cDNA 合成, 然后用 Human IL-8 RT-PCR Primer Set 来进行 PCR。

结果显示, 样品中即使存在 RNase, 加入 RNase Inhibitor 后 RNA 也未见分解, 能顺利进行 RT-PCR 反应。



M: 100bp Ladder

- 1: RNase 不添加、RNase Inhibitor 不添加
2: RNase 不添加、RNase Inhibitor 添加
3: RNase 添加、RNase Inhibitor 不添加
4: RNase 添加、RNase Inhibitor 添加

产品内容:

RNase Inhibitor(20~40U/μl)

组成:

20mM	Hepes-KOH(pH7.6)
50mM	KCl
8mM	DTT
50%	Glycerol

活性的定义:

抑制 5ng 的 RNase A 活性的 50% 的酸可溶性核糖核酸酶进行纯化所需要的酶量为 1U。

来源:

E. coli 重组体 (Recombinant type)

保存条件:

-20°C

比活性:

100U/μg protein

参考文献:

- 1) J.Sambrook et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory(1982)
- 2) G.Scheele, and P.Blackburn, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **76**:4898-4902(1979)
- 3) P.Blackburn et al., *J.Biol.chem.*, **252**: 5904-5910(1977)
- 4) P.Blackburn, and B.Jaikhani, *J.Biol.Chem.*, **254**: 12488-12493(1979)

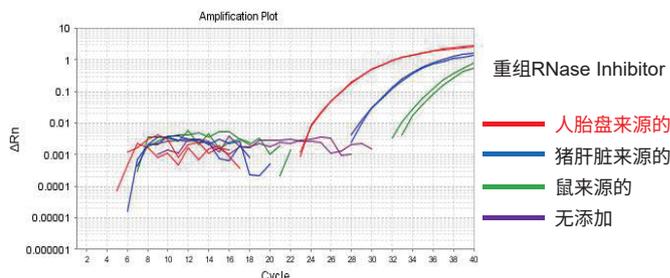
备注:

本产品一般在其他酶的反应 buffer 中进行使用, 但反应液中的 DTT 浓度至少要有 1mM。其反应液的 pH 值最好在 5.0~8.0 之间。

2 不同来源的 RNase Inhibitor 使用效果对比

往 2500 个 U937 细胞中分别加入人胎盘 (TOYOBO)、猪肝脏、鼠来源的重组 RNase Inhibitor 后, 用蛋白酶 K 裂解处理, 随后以此裂解液为模板合成 cDNA, 用荧光定量的方法测定各自的基因表达量。

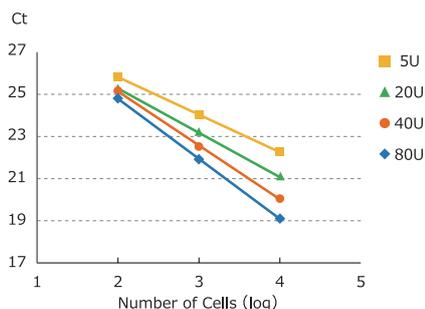
结果显示, 使用人类胎盘来源的重组 RNase Inhibitor 时, 能够得到的 cDNA 量最多。由此得出, 根据 RNase Inhibitor 来源的差异, 抑制效果将会有不同, 相比其他动物来源的 RNase Inhibitor, 人胎盘来源的 RNase Inhibitor 抑制效果更佳。



3 不同添加量的 RNase Inhibitor 在 RT-qPCR 中的效果

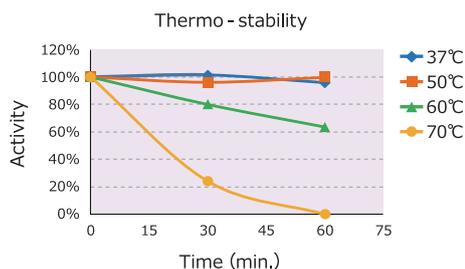
将高活性的 RNase U937 细胞分为三组, 数量分别为 100, 1,000, 10,000 个, 每组均进行加入 5, 20, 40, 80U 四种不同浓度 RNase Inhibitor (Code No.SIN-201) 的添加测试, 细胞裂解后合成 cDNA, 并进行荧光定量分析。

分析 Ct 值后得出, 随着 RNase Inhibitor 量的增加, Ct 值相应减少。由此可见, 如果添加足量的 RNase Inhibitor, 可以抑制 RNA 降解, 提高实验精度。



4 热稳定性测试

在 37-70°C 温度下将 RNase Inhibitor 进行 0-60 分钟的热处理后, 测定其剩余活性。结果得出, 即使在 50°C 的温度进行 60 分钟热处理的情况下, 活性依然保持不变。由此可见, 本产品可在 30-50°C 的温度范围内, 可以正常发挥 RNase 抑制作用。



		Incubation time (min.)		
		0	30	60
Temperature	37°C	100%	102%	96%
	50°C	100%	96%	100%
	60°C	100%	80%	64%
	70°C	100%	24%	0%

→ 相关产品

1 逆转录酶				
ReverTra Ace®	TRT-101	10,000U	¥800	→ 3-14 页
2 RNA 多聚酶				
Thermo T7 RNA Polymerase 《T7》	TRL-201	7,500U	¥500	→ 4-15 页

逆
转
录

cDNA 合成试剂盒选择指导

东洋纺使用高效率逆转录酶 ReverTra Ace® 生产出了各种各样的 cDNA 合成试剂盒。根据用途不同进行分类可有效地推动实验进程。

产品名称	适用	裂解液的稳定性	效率	合成 cDNA 的长度	Master Mix	基因组 DNA 去除	页面
ReverTra Ace - α -®	常规 PCR	-	++	++(>10kb)	-	-	3-14
ReverTra Ace® qPCR RT Kit	qPCR	-	++	++(<5kb)	-	-	3-12
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	qPCR	-	++	++(<5kb)	✓	-	3-10
ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	qPCR	-	++	++(<5kb)	✓	✓	3-10
SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR	从培养细胞裂解液开始的 qPCR	++	+	++(<10kb)	✓	✓	3-5