



12-03

**ReverTra Ace qPCR RT Master Mix  
with gDNA Remover**  
**去基因组 DNA**  
(Code No. FSQ-301)

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department  
OSAKA JAPAN

# 目 录

【1】 简介 .....	1
【2】 产品介绍 .....	2
【3】 其他必需品 .....	3
【4】 使用方法 .....	4
【5】 APPENDIX .....	6
【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**。此外，对于本产品的有害性调查还不十分全面，因此，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。

## 【 保存 】

所有组分请均保存于**-20℃**条件下。**长期不用时，请在-30℃条件下保存。**

## 【1】 简介

**ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover** 是增加了去除基因组 DNA (gDNA) 功能的 Realtime PCR 用逆转录反应试剂盒，使用了本公司高效率逆转录酶「ReverTra Ace」。

通过 Realtime PCR 进行基因表达分析时，cDNA 的检测非常重要。但是，用过柱纯化式的 RNA 抽提试剂盒或 AGPC(Acid Guanidium - Phenol - Chloroform)法纯化的 Total RNA 中经常会混入微量的 gDNA。当检测目的基因中存在假基因，或无法在横跨内含子位置上设计引物时，混入的 gDNA 会被当作模板扩增，影响准确的定量。

本试剂盒中添附了具有强力 DNA 分解活性的 gDNA Remover，通过该组分将混入模板 RNA 的 gDNA 分解后，无需纯化即可对 RNA 进行逆转录，可简便地配制出不含 gDNA 的 cDNA。此外，所有用于反应的试剂已预混，可非常容易地配制反应液。

本产品不含 Realtime PCR 试剂，进行 Realtime PCR 实验时，推荐我司高性能 Realtime PCR 试剂 THUNDERBIRD qPCR Mix 或 Realtime PCR Master Mix 系列（请参考[7]相关产品）。

### ◆本产品特征◆

#### **1. 可简便、迅速地去除基因组 DNA 和合成 cDNA**

按顺序添加去除 DNA 反应试剂和逆转录反应试剂，只需约 20 分钟的操作，即可实现去除基因组 DNA (gDNA) 和合成 cDNA。

#### **2. 预混型试剂**

去除 DNA 反应的试剂和逆转录反应试剂均为在 -20℃ 条件下也不会冻结的预混型试剂，同时，由于还添附了预混型 no-RT Control，可非常简便地配制逆转录反应（-）的对照反应液。

#### **3. 可对 RNA 的整个区域进行均一的逆转录反应**

采用了最适用于 Realtime PCR 用 cDNA 合成的反应 buffer，和按最佳比例混合的 Primer mix (Oligo dT 及 Random Primer)，可对 RNA 的整个区域进行均一、高效率的逆转录反应。

#### **4. 与 Realtime PCR 试剂的高适应性**

采用了对 Realtime PCR 的反应体系影响最小的组分，即便向 PCR 反应液中带入最多 20% 液量的逆转录反应液，也能显示出很好的线性。最适用于低表达量 mRNA 的高灵敏度检测。

## 【2】 产品介绍

本产品包含以下试剂，10 $\mu$ l 反应体系可用 200 次。同时还添附有 10 $\mu$ l 反应体系可用 20 次的 5x RT Master Mix II no-RT Control。所有组分请均保存在 -20 $^{\circ}$ C 条件下<sup>(注 1)</sup>。

试剂名	保存条件 <sup>(注 1)</sup>	容量
gDNA Remover	-20 $^{\circ}$ C	10 $\mu$ l
4x DN Master Mix	-20 $^{\circ}$ C	440 $\mu$ l
5x RT Master Mix II <sup>(注 2, 3)</sup>	-20 $^{\circ}$ C	400 $\mu$ l
5x RT Master Mix II no-RT Control	-20 $^{\circ}$ C	40 $\mu$ l
Nuclease-free Water	-20 $^{\circ}$ C	1000 $\mu$ l x2

### **gDNA Remover**

该组分是最适合于本试剂盒的 DNase I。按 1/50 的比例添加到 4x DN Master Mix 中，由于液量很少，使用前请 spin down 混匀。

### **4x DN Master Mix**

该组分是含 RNase inhibitor 及反应 buffer 的 4x 浓度的预混液。最开始使用时，可在整管 4x DN Master Mix (440 $\mu$ l) 中添加 8.8 $\mu$ l (1/50 量) 的 gDNA Remover，颠倒混匀后再使用。添加 gDNA Remover 的 4x DN Master Mix 在 -20 $^{\circ}$ C 条件下可至少保持 3 个月的稳定。短时间内无法使用完毕时，请少量混合后使用（如：4x DN Master Mix 220 $\mu$ l + gDNA Remover 4.4 $\mu$ l）。

### **5x RT Master Mix II**

该组分是高效率逆转录酶 ReverTra Ace、Random Primer、Oligo dT Primer、反应 buffer、dNTPs 等的 5x 浓度的预混液。

### **5x RT Master Mix II no-RT Control**

该组分是从 5x RT Master Mix II 中去除了 ReverTra Ace 后的 Master mix，可用于配制逆转录（-）的对照溶液。

### **Nuclease-free Water**

该组分是 Nuclease-free 级别的灭菌蒸馏水。为防止影响聚合酶的活性，未进行 DEPC 处理。

注 1) 长期不用时，请在 -30 $^{\circ}$ C 条件下保存。

注 2) 逆转录反应时，需要来自 4x DN Master Mix 的成分，因此 5x RT Master Mix II

不能单独使用。请务必使用 4x DN Master Mix 进行去除 gDNA 的反应。

注 3) 本试剂盒中添附的 5x RT Master Mix II 与本公司不带基因组 DNA 去除功能的试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Code No.FSQ-201)中所含的 5x RT Master Mix 组成不同, **不能混用**。请务必使用本试剂盒中添附的 5x RT Master Mix II。

注 4) 无论哪个组分, 打开盖子前, 都请先 spin down, 使液体都落到离心管底部后再使用。另外, 除 Nuclease-free Water 以外的试剂, 都有粘性, 请小心使用移液器。

注 5) 本产品是含有逆转录引物 (Random Primer 及 Oligo dT Primer) 的预混试剂, 不能使用基因特异性引物(Gene Specific Primer)。

### 【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、50°C、65°C以及98°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的基因之外, 通常情况下都可以明显地检测到作为模板的Total RNA。

## 【4】 使用方法

### (1) 4x DN Master Mix与gDNA Remover的混合(仅在初次使用时)

在整管4x DN Master Mix (440 $\mu$ l)中添加8.8 $\mu$ l(1/50量)的gDNA Remover, 颠倒混匀。添加gDNA Remover后的4x DN Master Mix在-20 $^{\circ}$ C条件下至少可保持3个月的稳定。

- 短时间内无法使用完毕时, 请少量混合后使用。  
(如: 4x DN Master Mix 220 $\mu$ l + gDNA Remover 4.4 $\mu$ l)

### (2) RNA的变性(option)\*

把RNA在65 $^{\circ}$ C条件下热变性5分钟后, 立即置于冰上冷却。

\*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, 初次实验时, 建议探讨条件。(进行以上步骤处理时, 请不要添加4x DN Master Mix。)

### (3) 去除基因组DNA反应(DNase反应)

请在冰上配制如下反应液。

4x DN Master Mix (已添加gDNA Remover)	2 $\mu$ l
RNA template	0.5pg~0.5 $\mu$ g
Nuclease-free Water	
<hr/>	
Total	8 $\mu$ l

将反应液轻轻地搅拌均匀后, 在37 $^{\circ}$ C条件下温育5分钟。

- 可根据需要, 扩大反应体系。

### (4) 逆转录反应

接着, 在冰上配制如下反应液。

步骤(3)的反应液	8 $\mu$ l
5x RT Master Mix II	2 $\mu$ l
<hr/>	
Total	10 $\mu$ l

· 进行逆转录(-)对照时, 可用5x RT Master Mix II no-RT Control代替5x RT Master Mix II。通过逆转录(-)的对照, 可确认信号是否来自cDNA。

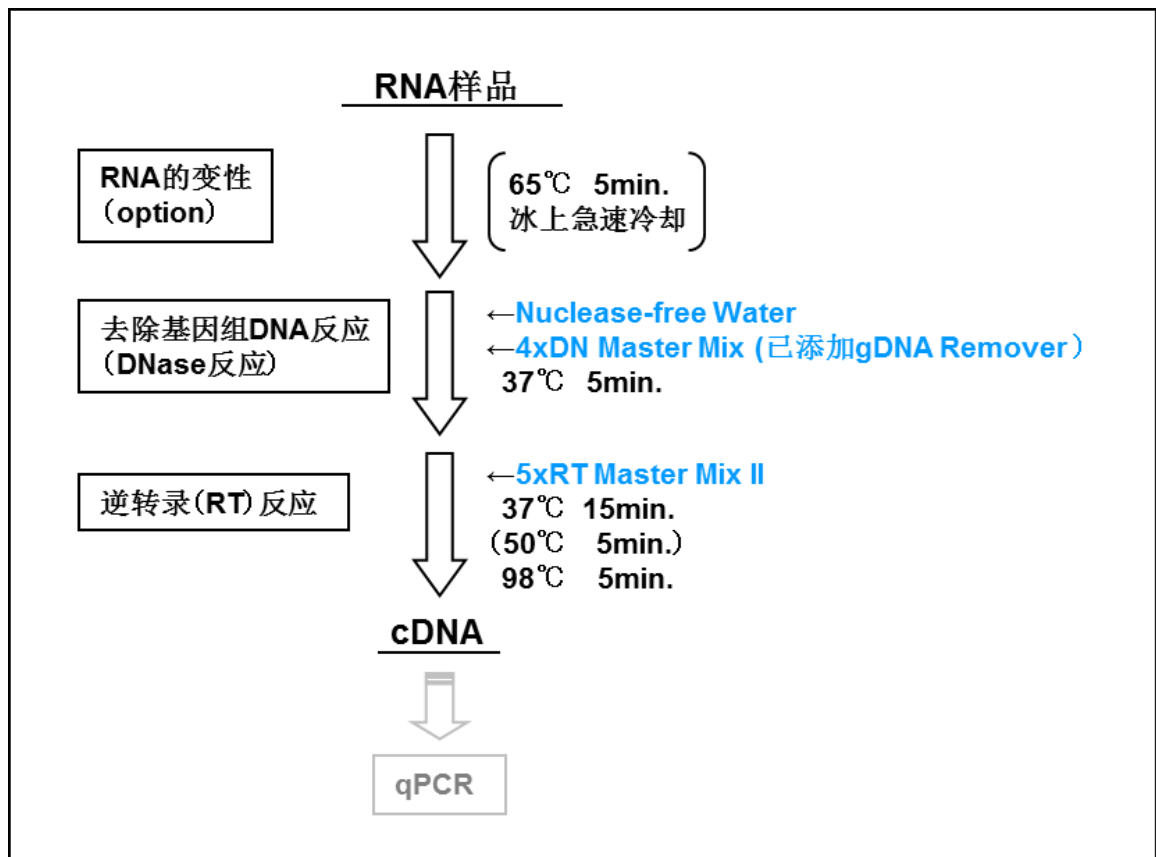
将反应液轻轻地搅拌均匀后，按以下温度进行反应。

37°C,	15min.	}	(逆转录反应)
50°C,	5min. (option)**		
98°C,	5min. ....	}	(酶失活反应)
4°C,	hold		

\*\* ReverTra Ace经改良后提高了高温反应性，应用在本试剂盒中，提高了逆转录效率。

反应结束后，请在4°C或-20°C条件下保存。Realtime PCR时，作为模板直接或稀释后添加。

• 添加到PCR反应液中的逆转录反应液，最多请不要超过20%。过量的添加会导致PCR反应效率低下，无法准确地定量。



## 【5】 Appendix

### 实验例1:gDNA去除效果的确认

#### <方法>

##### cDNA合成

试剂:本试剂盒ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover  
(Code No.FSQ-301)

模板:自制的HeLa total RNA 0.5 $\mu$ g /10 $\mu$ l反应体系

条件:用gDNA Remover添加(+)、或不添加(-)的4x DN Master Mix去除gDNA后,再分别用5x RT Master Mix II或5x RT Master Mix II no-RT Control进行逆转录反应。

	4x DN Master Mix	5x RT Master Mix
①	- gDNA Remover	- RTase
②	- gDNA Remover	+ RTase
③	+ gDNA Remover	- RTase
④	+ gDNA Remover	+ RTase

##### Realtime PCR

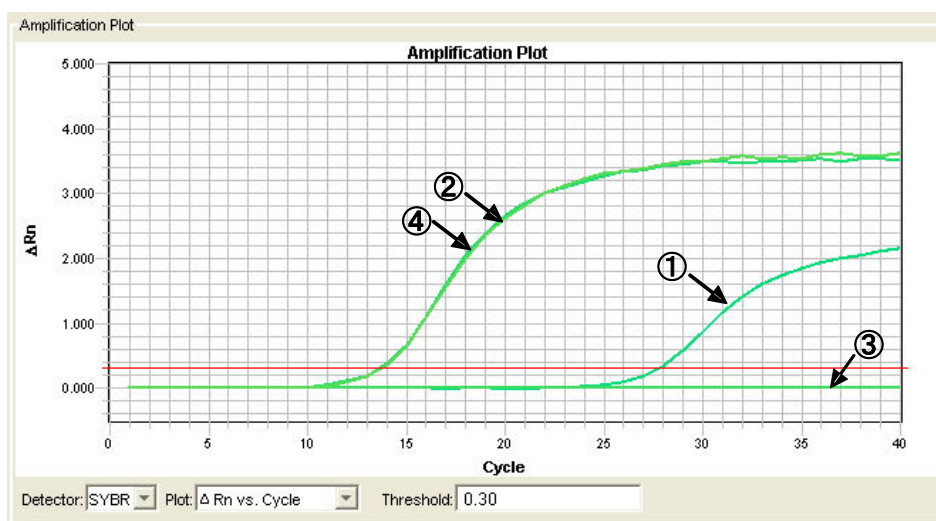
试剂:THUNDERBIRD SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix (Code No.QPS-201)

模板:上述cDNA2 $\mu$ l/20 $\mu$ l反应体系(带入量10%)

Target: ACTB(188bp)

测定用仪器: Applied Biosystems 7900HT

#### <结果>



条件③的情况下,没有确认到扩增,说明基因组DNA已被去除。



## 实验例2:cDNA合成量(标准曲线)的比较

### <方法>

#### cDNA合成

试剂:

本试剂盒ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover  
(Code No.FSQ-301)

及

不含去除基因组DNA功能的同类品ReverTra Ace qPCR RT kit  
(Code No.FSQ-101)

模板:HeLa total RNA 1pg, 10pg, 100pg, 1ng, 10ng, 100ng, 1 $\mu$ g /20 $\mu$ l反应体系  
(只在FSQ-301的反应体系中添加了100ng人基因组DNA)

#### Realtime PCR

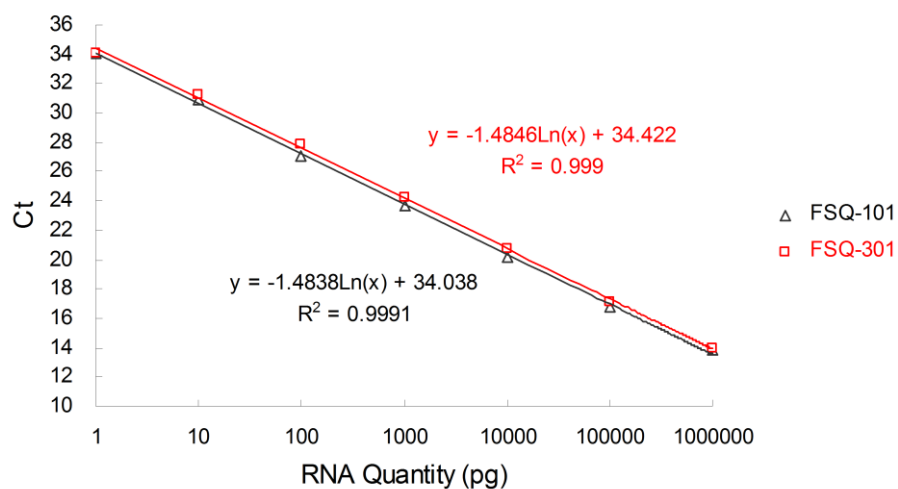
试剂:THUNDERBIRD SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix (Code No.QPS-201)

模板:上述cDNA2 $\mu$ l/20 $\mu$ l反应体系(带入量10%)

Target: GAPDH(65bp)

测定用仪器: Applied Biosystems 7900HT

### <结果>



结果可见,使用本产品(FSQ-301),未受基因组DNA混入的影响,和不含去除基因组DNA功能的FSQ-101一样,可获得很高的直线性。由此可见,使用FSQ-301可在很广的RNA浓度范围内,进行同等效率的逆转录。

## 【6】 常见问题

现象	原因	对策
Realtime PCR时检测无信号, 或者信号出现延迟	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的量过多或过少	经确认, 使用本产品时, 添加0.5pg~0.5µg范围的RNA量(10µl反应体系)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。
	RNA容易形成高级结构	RNA容易形成高级结构的情况下, 会抑制逆转录反应。建议在逆转录反应前, 将RNA在65°C条件下热变性5分钟, 然后急速在冰上冷却后再使用。然后(或者)在37°C·15分钟逆转录反应后, 再追加50°C·5分钟的反应。
	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	逆转录反应液添加量过多会抑制PCR反应, 因此添加到PCR反应液中的逆转录反应液最好能控制在10%以下。
用no-RT Control的反应液进行Realtime PCR时可确认到扩增	RNA中混入了过量的基因组DNA	经确认, 使用本产品可最多去除约50ng的基因组DNA(10µl反应体系)。但模板RNA中混入过量DNA时, 也有可能不能完全去除干净。请另外再进行DNase I处理, 再次纯化模板RNA。
	产生了引物二聚体	融解曲线分析时, no-template control在目的片段的低温侧出现峰值, 疑似有引物二聚体产生。除引物序列外, 引物二聚体因引物质量不好而产生。此时应先再次摸索PCR反应条件, 如果仍无法改善, 则可进行引物再设计或再合成。再次合成时, 纯化级别应在HPLC以上。

## 【7】 相关产品

### Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂

品名	容量	Code No.
Realtime PCR用cDNA合成试剂盒 <b>ReverTra Ace qPCR RT Kit</b>	200次份	FSQ-101
Realtime PCR用cDNA合成Master Mix <b>ReverTra Ace qPCR RT Master Mix</b>	200次份	FSQ-201

### Realtime PCR 试剂

品名	容量	Code No.
Realtime PCR用Master Mix(Probe Assay用) <b>Realtime PCR Master Mix</b>	1ml x 5	QPK-101
Realtime PCR用Master Mix(SYBR <sup>®</sup> Green Assay用) <b>SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix</b>	1ml x 5	QPK-201
Realtime PCR用Master Mix(SYBR <sup>®</sup> Green Assay用) <b>SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix -plus-</b>	1ml x 5	QPK-212
各种荧光Probe·荧光Primer检测体系用 Realtime PCR试剂 <b>THUNDERBIRD Probe qPCR Mix</b>	1ml x 1 1.67ml x 3	QPS-101T QPS-101
SYBR <sup>®</sup> Green I检测体系用Realtime PCR试剂 <b>THUNDERBIRD SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix</b>	1ml x 1 1.67ml x 3	QPS-201T QPS-201

※THUNDERBIRD qPCR Mix 中，50X ROX reference dye 另外单独添附。

### One-step PCR 试剂

品名	容量	Code No.
One-step Realtime PCR用Master Mix (Probe Assay用) <b>RNA-direct Realtime PCR Master Mix</b>	0.5ml x 5	QRT-101
One-step Realtime PCR用Master Mix (SYBR Green Assay用) <b>RNA-direct SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix</b>	0.5ml x 5	QRT-201

※RNA-direct 系列中，50mM Mn(OAc)<sub>2</sub> 另外单独添附。

◆详情请浏览本公司中文网页

<http://www.bio-toyobo.cn>

[销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

地址：上海市浦东新区张杨路 500 号华润时代广场 28 楼 AL

邮编：200122

订购 · 技术相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

[生产商]

东洋纺株式会社敦贺生物工厂

地址：日本国福井县敦贺市东洋町 10 番 24 号

代理商资料：