

RevertAid™第一链cDNA Synthesis试剂盒

#K1621, #K1622

分析证明书

#K1621

Lot

质量控制

采用100 fg对照GAPDH RNA和对照引物进行RT-PCR反应，通过在1%琼脂糖上进行凝胶电泳和溴化乙锭染色显示得到足够量的496 bp的产物

质量认证人：Jurgita Zilinskiene

目录

	页码
试剂盒组成.....	2
存储条件.....	2
产品说明.....	2
注意事项.....	3
操作步骤.....	6
RT-PCR.....	6
合成cDNA用于克隆.....	7
实验对照.....	8
问题分析与解决.....	10

试剂盒成分

RevertAid™第一链cDNA合成试剂盒	20 次 #K1621	100 次 #K1622
RevertAid™ M-MuLV反转录酶 (200 u*/μl)	25 μl	120 μl
RiboLock™ RNA酶抑制剂 (20 u**/μl)	25 μl	120 μl
5×反应缓冲液 (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)	150 μl	500 μl
10mM dNTP 混合物	50 μl	250 μl
Oligo(dT) ₁₈ 引物 100 μM, 0.5 μg/μl (15 A ₂₆₀ u/ml)	25 μl	120 μl
随机六聚体引物 100 μM, 0.2 μg/μl (6 A ₂₆₀ u/ml)	25 μl	120 μl
GAPDH正向引物, 10 μM 5' – CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG – 3'	20 μl	20 μl
GAPDH反向引物, 10 μM 5' – GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG – 3'	20 μl	20 μl
对照GAPDH RNA 1.3 kb 3'-poly(A) tailed RNA transcript, 0.05 μg/μl	20 μl	20 μl
无核酸酶高纯度水	2x1.25 ml	2x1.25 ml

* 一个单位的RevertAid™M-MLV反转录酶在37℃ 10 分钟将1 nmol 的dTTP转化为多核苷酸组分（吸附在DE81上）。

** 一个单位的RiboLock™RNase酶抑制剂抑制5ng RNA酶A 50%的活性。

存储条件

试剂盒中所有组分应存储在-20℃。对照用RNA可存储于-70℃以便长期使用。

产品说明

RevertAid™第一链cDNA合成试剂盒以mRNA或者总RNA为模板，高效合成第一链cDNA。本试剂盒使用RevertAid™ M-MuLV反转录酶，它的RNA酶H的活性与AMV反转录酶相比较低。该反转录酶可耐受42-50℃温度，合成的cDNA片段长度达13kb。

试剂盒中含有RiboLock™ 重组RNA酶抑制剂，防止RNA降解，可耐受55℃高温。

试剂盒同时含有oligo(dT)₁₈和随机六聚体引物。随机六聚体引物与模板非特异性地结合，以总RNA中任何RNA为模板合成cDNA。oligo(dT)₁₈选择性和RNA 3'poly(A)配对结合，只以有poly(A)尾巴的mRNA为模板合成cDNA。使用本试剂盒也可采用序列特异性引物。

合成的第一链cDNA能直接用作PCR或荧光定量PCR的模板，第二链cDNA的合成或线性RNA扩增，也可用于需要用带有放射性或非放射性核苷酸标记第一链cDNA的实验，比如将标记好的第一链cDNA作为杂交实验中的探针或者用于微阵列分析。

注意事项

避免核酸酶污染

RNA的纯度和完整性对于合成全长cDNA至关重要。RNA很容易被RNA酶A降解，而RNA酶A广泛稳定地存在于实验室中。试剂盒中的所有成分都经过了无RNA酶的严格验证并保证不含有RNA酶。为防止污染，实验室和所有实验准备工作都必须保证没有RNA酶污染。

避免RNA酶污染的常规建议：

- 用DEPC处理实验用到的所有管子和枪头，或者购买已经证明无核酸酶的实验用具。
- 整个实验过程戴手套，因为皮肤是RNA酶的一个常见来源。并经常更换手套。
- 使用无RNA酶的试剂，即使是超纯水也要确保无RNA酶（比如#R0581，无RNA酶的高纯度水）
- 使用RNA酶抑制剂，比如试剂盒中提供的Fermentas RiboLock™RNA酶抑制剂来保护RNA。
- 试剂盒如不使用，要严格密封保存。在反转录过程中，所有管子要确保扣严。

模板RNA

通过标准方法得到的细胞总RNA可用本试剂盒获得第一链cDNA。纯化过的RNA要保证不含有盐，金属离子，乙醇和苯酚，因为以上成分会干扰第一链cDNA的合成反应。可采用乙醇沉淀RNA的方法去除掉痕量污染物（然后再用75%冷乙醇冲洗沉淀两次）。如果要进行RT-PCR，模板RNA要确保没有DNA污染。在进行cDNA合成前，模板RNA必须用无RNA酶的DNA酶I（#EN0521）处理去除掉痕量DNA。实验过程要设置无RT对照反应，即此对照反应中含有除逆转录酶以外的其他所有RT-PCR成分（RT-对照）。

去除RNA中基因组DNA的实验步骤：

1. 将以下成分加入到一个无RNA酶的管子中：

RNA	1µg
10×反应缓冲液（含有MgCl ₂ ）	1µl
DNA酶I，无RNA酶（#EN0521）*	1µl（1u）
无核酸酶的高纯度水	加到10µl

* 对于每1µg RNA，不要使用超过1u的DNA酶I（不含RNA酶的）。

2. 37°C 孵育 30 分钟。

3. 加入1 µl 50 mM EDTA，65°C 孵育10分钟。在含有二价阳离子(1)而缺乏螯合剂的环境中，RNA会水解。或者可采用酚/氯仿试剂抽提的方法来替代加EDTA孵育这一步骤。

4. 使用制备好的RNA为模板进行逆转录反应。

RNA样品品质

在进行cDNA合成前，要先评估RNA的完整性。最经常使用的方法是跑变性的琼脂糖凝胶，然后用溴化乙锭（简称EB，下同）染色。如果来源于真核细胞的总RNA在跑完胶后可清晰看到18s和28s rRNA

的条带，可认为RNA是完整的。28s rRNA的条带亮度约为18s rRNA的两倍。任何拖尾条带都是mRNA降解的信号。如果这种拖尾条带出现，需要重新提取总RNA样品。

为了进行RT-PCR，需要评价纯化的RNA（人类，小鼠或大鼠）的适用性。常用方法是在RT-PCR中设置对照，此对照含有试剂盒中提供的模板RNA和对照用GAPDH引物。GAPDH特异性引物与人，小鼠，大鼠的GAPDH基因完全互补，RT-PCR扩增后得到496bp的产物。

RNA 样品用量

- 0.1 ng - 5 µg的总RNA或者1 ng - 500 ng的poly(A) mRNA作为模板合成第一链cDNA，此反应可作为两步法RT-PCR中的起始步骤。
- 使用1 µg分离纯化的mRNA作为模板合成的第一链cDNA，可用于第二链合成或者后续克隆反应。

引物

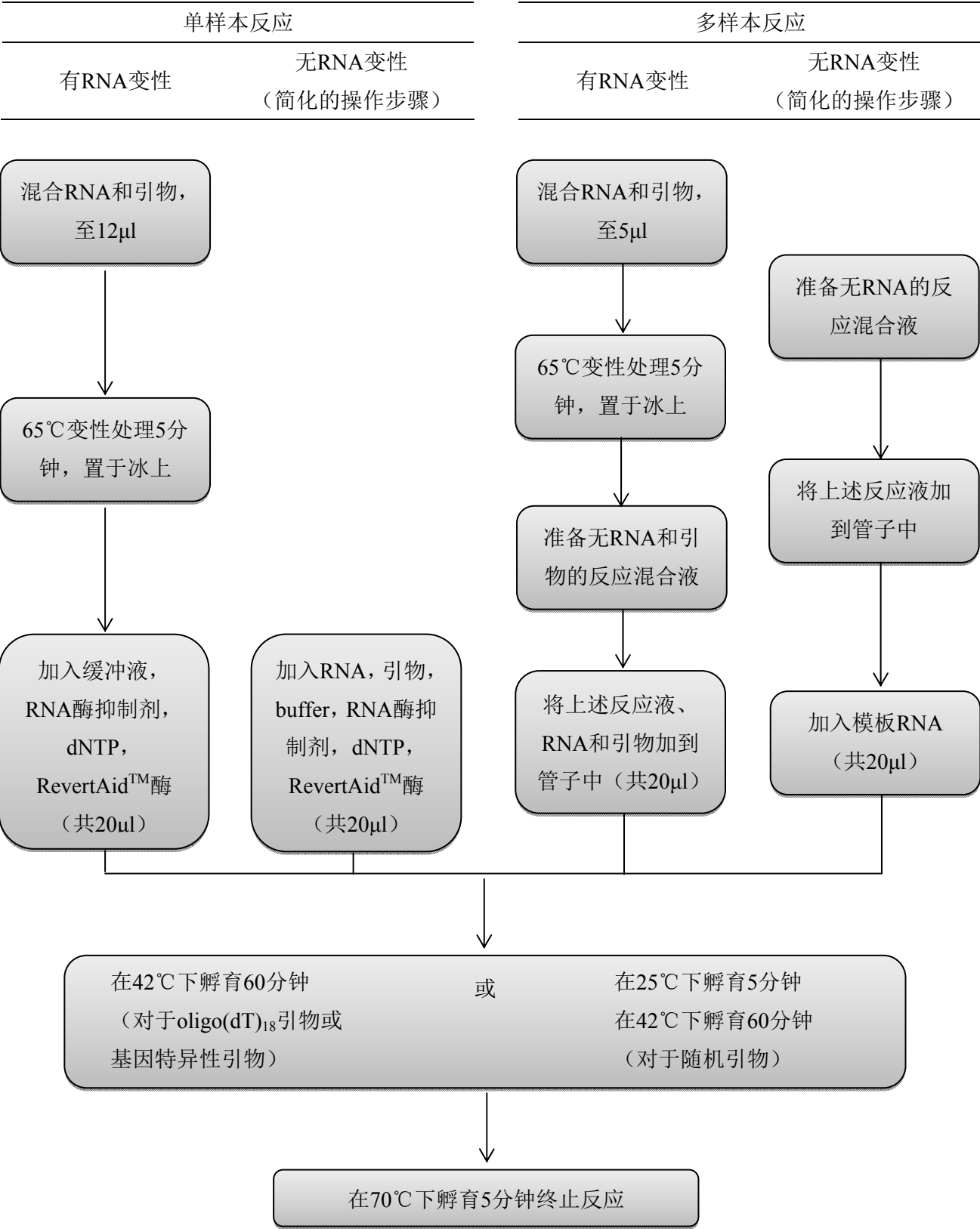
合成第一链cDNA使用的引物可为oligo(dT)₁₈引物，随机六聚体引物或者基因特异性引物中的任意一种。Oligo(dT)₁₈引物针对具有3'poly(A)尾巴的真核mRNA。随机六聚体引物适用于总RNA（rRNA或者mRNA）。因此，相对Oligo(dT)₁₈，使用随机六聚体引物会得到更复杂的第一链cDNA混合物，这样会降低后续PCR实验的特异性和精确性。但是随机引物在以下几种情况中是有优势的：比如没有poly(A)尾巴的mRNA或者使用富含poly(A)结构的RNA为模板。基因特异性引物用于从总RNA或者mRNA混合物中合成特异性的某条或者几条cDNA，这种特异引物需要使用者自己提供。

第一链cDNA合成过程

第一链cDNA合成可进行单样本反应，可以使用不同的模板平行进行多样本反应。因此，准备反应混合物可每种反应组分单独加入，也可使用master mix（master mix含有除去模板RNA的以外的其他反应组分）。取决于RNA模板结构的情况，将变性和退火分开操作可能会提高RT-PCR的特异性和精确度。

下面图表描述的是第一链cDNA合成的主要步骤。详细步骤请见第六页。图表中描述了包括RNA变性步骤的单样本反应和使用不同模板的多样本反应流程。与单样本反应相比，多样本反应采用相同的反应体系（20ul）和相同的试剂用量，但试剂的加入顺序有所不同（见下图）。

图表1. 合成cDNA的单样本反应和多样本反应的实验过程概述



操作步骤

开始前请先阅读第3-5页的注意事项。

RT-PCR

I. 第一链cDNA合成

融化后，将试剂盒中各组分混匀并稍微离心，离心后置于冰上。

1. 在置于冰上的无菌无核酸酶的PCR管中，按照顺序加入下面的反应物。

模板 RNA	总RNA	0.1 ng - 5 µg
	或者poly(A) mRNA	10 pg - 0.5 µg
	或者特异性 RNA	0.01 pg - 0.5 µg
引物	oligo (dT) ₁₈ 引物	1 µl
	随机六聚体引物	1 µl
	基因特异性引物	15-20 pmol
无核酸酶的高纯水		到12µl
总体积		12µl

2. 可选优化步骤。如果RNA模板GC含量高或者含有二级结构，将模板和引物的混合液轻轻混匀，短暂离心，65°C 孵育5分钟，冰上冷却，离心，再置于冰上冷却。

3. 将下列组分按照顺序加入

5X Reaction Buffer	4 µl
RiboLock™ RNA酶抑制剂 (20 u/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid™ M-MuLV 逆转录酶(200 u/µl)	1 µl
总体积	20 µl

4. 轻轻混匀，离心。

5. 如果使用oligo(dT)₁₈或者基因特异型引物，42°C孵育60分钟。

如果使用随机六聚体引物，25°C先孵育5分钟，随后42°C孵育60分钟。

注意：高GC含量的模板反应温度可升高至45°C。

6. 70°C加热5 min终止反应。

反应产物可直接用于PCR反应或者在-20°C 保存少于一周的时间。如想延长保存时间，建议使用-70°C 保存。

II. 第一链cDNA的PCR扩增

合成的第一链cDNA可直接用于PCR或qPCR。第一链cDNA反应液体积不能超过PCR反应体系的1/10。通常50 µl 的PCR反应体系中，第一链cDNA反应液加入2µl。Taq DNA聚合酶，PCR Master Mix

(2X) 或者PyroStart™ Fast PCR Master Mix (2X) 可用于扩增小于3kb的片段。DreamTaq™ DNA 聚合酶扩增至6kb长的片段。对于20 kb 的长片段, 建议使用Long PCR Enzyme Mix 和 High Fidelity PCR Enzyme Mix。

合成cDNA用于克隆

I.第一链cDNA合成

融化后, 将试剂盒中各组分混匀并短暂离心, 离心后置于冰上。

1. 在置于冰上的无菌无核酸酶的PCR管中, 按照顺序加入下面的反应物。

模板 RNA	poly(A) mRNA	1 µg
	或特异性 RNA	0.5-1 µg
引物	oligo (dT) ₁₈ 引物	1 µl
	或随机六聚体引物	1 µl
	或基因特异性引物	100 pmol
无核酸酶的高纯水		至12µl
总体积		12µl

2. 可选优化步骤。如果RNA模板GC含量高或者含有二级结构, 轻轻混匀, 短暂离心, 65°C 孵育5分钟, 冰上冷却, 离心, 再置于冰上冷却。

3. 将下列成分按照顺序加入

5X Reaction Buffer	4 µl
RiboLock™ RNA酶抑制剂 (20 u/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid™ M-MuLV 逆转录酶(200 u/µl)	1 µl
总体积	20 µl

4. 轻轻混合, 离心。

5. 如果使用oligo(dT)₁₈或者基因特异型引物, 42°C孵育60分钟。

如果使用随机六聚体引物, 25°C先孵育5分钟, 随后42°C孵育60分钟。

注意: 高GC含量的模板反应温度可升高至45°C。

6. 70°C加热5 min终止反应。

反应产物可直接用于PCR反应或者在-20°C 保存少于一周。如想延长保存时间, 建议使用-70°C 保存。

II.第二链cDNA合成

1. 在冰上将下表的组分加入到20 µl第一链cDNA反应混合液中:

10X Reaction Buffer (适用于DNA聚合酶I)	8 μ l
RNA酶H, <i>E.coli</i> (#EN0201)	1u
DNA聚合酶 I, <i>E.coli</i> (#EP0041)	30u
无核酸酶的高纯水	至100 μ l
总体积	100 μ l

2. 轻轻混匀，短暂离心。

3. 15°C孵育2小时。温度不要高于15°C。

4. 加入12.5 u T4 DNA聚合酶 (#EP0061)，15°C孵育5 min。

5. 加入5 μ l of 0.5 M EDTA, pH 8.0 (#R1021)终止反应。

6. 通过酚/氯仿抽提纯化平端的cDNA，以用于的克隆相关实验，比如：接头连接，磷酸化，片段大小分离，连接和转化。

实验对照

应该采用阴性和阳性对照来验证第一链cDNA合成的结果。

- **无逆转录酶的阴性对照 (RT-)** 在PCR或者qPCR反应中很重要，它可用于评估基因组DNA对RNA样品的污染状况。RT-对照组不含有逆转录酶，但含有实验所需的其他组分。

- **无模板的阴性对照 (NTC)** 对于检测反应试剂的污染情况很重要。NTC对照组不含有RNA模板，但含有实验所需的其他组分。

- **阳性对照** 试剂盒中已经提供阳性对照所需的RNA模板和基因特异性引物。人GAPDH对照RNA(1.3kb)是通过体外转录方式得到的。GAPDH特异性引物与人，小鼠，大鼠的GAPDH基因完全互补，RT-PCR后的产物长度大约496bp。下面是阳性对照的操作步骤。

I. 阳性对照第一链cDNA的合成反应

融化后，将试剂盒中各组分混匀并短暂离心，离心后置于冰上。

1. 在置于冰上的无菌无核酸酶的PCR管中，按照顺序加入下面的反应物。

对照GAPDH RNA (50 ng/ μ l)	2 μ l
Oligo (dT) ₁₈ 引物 或随机六聚体引物 或基因特异性引物	1 μ l
5X Reaction Buffer	4 μ l
RiboLock™ RNA酶抑制剂 (20 u/ μ l)	1 μ l
10 mM dNTP Mix	2 μ l
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ μ l)	1 μ l
无核酸酶的高纯水	9 μ l
总体积	20 μ l

2. 轻轻混匀离心。
3. 如果使用oligo(dT)₁₈或者基因特异型引物，42°C孵育60分钟。
如果使用随机六聚体引物，25°C先孵育5分钟，随后42°C孵育60分钟。
4. 70°C加热5 min终止反应。
5. 短暂离心，按照第九页的操作步骤进行对照PCR扩增。

II. 对照PCR扩增

1. 将第一链cDNA合成反应液（第8页）按照1:1000的比例用无核酸酶的水高纯水稀释。
2. 其他组分融化后，轻微震荡混匀并离心。
3. 薄壁PCR管置于冰上，加入下列试剂：

从对照RT反应得到的cDNA (1:1000 dilution)	2 µl
10X PCR buffer	5 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl (0.2 mM each)
25 mM MgCl ₂	3 µl
正向GAPDH Primer	1.5 µl
反向GAPDH Primer	1.5 µl
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 u/µl)	0.5 µl
无核酸酶的高纯水	35.5 µl
总体积	50 µl

4. 进行PCR反应，PCR仪要有加热的盖子，或者在PCR管中加入25µl 的矿物油。

步骤	温度, °C	时间	循环数
初始变性	94	3分钟	1
变性	94	30秒	35
退火	58	30秒	
延伸	72	45秒	

5. 将5-10 µl RT-PCR产物上1% 琼脂糖电泳。EB染色后应该清晰可见496 bp PCR产物。

问题分析与解决

存在问题	原因和解决办法
产物产量低或者没有RT-PCR产物	<p>RNA模板降解</p> <p>RNA的纯度和完整性对于合成全长cDNA非常重要。不要忘记在进行cDNA合成实验前检测RNA的完整性，真核细胞的RNA在跑完变性胶后可看到18s和28s rRNA的锐利条带。参考第3页的建议避免RNA酶的污染。</p> <p>模板纯度低</p> <p>RNA纯化过程中使用的一些痕量成分可能会残存在溶液中并抑制第一链合成，比如SDS，EDTA，胍盐，磷酸盐，焦磷酸盐，聚胺，亚精胺。可采用乙醇沉淀方法去除掉痕量污染物（乙醇重新沉淀RNA，再用75%冷乙醇冲洗沉淀）。</p> <p>RNA模板量不够</p> <p>模板增加到建议使用量。随后才用DNA酶I处理，在EDTA存在下（螯合镁离子），加热失活终止反应，具体操作见第3页。在缺乏螯合剂的加热的环境中，RNA会水解（1）。</p> <p>引物选择不正确</p> <p>使用针对RNA模板的正确引物。细菌RNA或者不含有poly（A）尾巴的RNA，使用随机六聚体引物替代oligo(dT)₁₈。确保序列特异性引物与模板的3'端互补。</p> <p>模板GC含量高</p> <p>如果模板GC含量高或者富含二级结构，将反转录温度提高到45°C。</p>
RT-PCR产物比预计的长	<p>RNA模板被基因组DNA污染</p> <p>基因组DNA中的内含子被扩增。在进行反转录之前用DNA酶I进行消化（详见第3页操作步骤）。为避免基因组DNA的扩增，引物设计在外显子和内含子连接区。</p>
阴性对照中含有RT-PCR产物	<p>RNA模板被基因组DNA污染</p> <p>PCR产物在RT-阴性对照中表明反应中有基因组DNA污染。在进行反转录之前用DNA酶I进行消化（具体详见第三页操作步骤）。</p>

参考文献

1. Wiame, I., et al., Irreversible heat inactivation of DNaseI without RNA degradation, BioTechniques, 29, 252-256, 2000.

RevertAid, RiboLock, PyroStart and DreamTaq 均为Fermentas持有的商标。

产品使用限制说明

本产品用于体外科学研究之用，不可用于诊断或者药物研发，也不可用于人类或者动物体。请登录www.fermentas.com查询此产品材料安全数据表。