

反转录系统



Precision Design... for Life
www.promega.com

原英文技术手册号码: TB099

本说明书用于产品 A3500。

所有的技术文献均可从公司网站 www.promega.com 得到

请访问公司网站以证实您所使用的技术手册为最新版本

I. 介绍.....	1
II. 产品组成	1
III. 反转录操作方法.....	2
A. 反转录反应.....	2
B. PCR 扩增反应的稀释.....	3
IV. 溶液及缓冲液的组成.....	4
V. 相关产品.....	5
VI. 参考文献.....	6

I. 介绍

AMV 反转录酶利用总 RNA 或 Poly(A)+RNA 合成单链 cDNA。反转录系统提供经过检验的试剂，能够在 15 分钟之内对总 RNA 或 Poly(A)+RNA 进行高效的反转录。同时提供一个 1.2kb 多聚腺苷酸尾的转录本作为 cDNA 合成反应的对照模板。利用反转录系统合成的 cDNA 可直接用于 PCR 反应。

II. 产品组成

产品	包装	目录号
反转录系统	100 次反应	A3500

实验室使用。每个系统提供足够进行 100 次反应所需的试剂，每次反应可处理 1µg RNA。包括：

- 1500u AMV 反转录酶（高浓度）
- 2500u 重组的 RNasin[®] 核糖核酸酶抑制剂
- 50µg Oligo(dT)₁₅ 引物 (0.5µg/µl)
- 50µg 随机引物 (0.5µg/µl)
- 5µg 1.2kb 卡那霉素阳性对照 RNA (0.25µg/µl), 10µl

注意：本中文操作手册仅供实验参考，在实际使用中请详细对照原英文技术手册 TB281。如遇到问题请与

Promega 公司北京办事处联系，免费电话: 8008108133; E-mail: promega@promega.com.cn

技术手册号码: CTB099

1. 本系统的有关问题，请与当地的 Promega 办事处或代理商联系。联系信息可从以下方式获得：

www.promega.com

E-mail:

techserv@promega.com

- 320µl dNTP 混合物, 10mM
- 1.4ml 反转录 10 X 缓冲液
- 1.2ml MgCl₂, 25mM
- 13ml 无核酸酶的水
- 1 技术手册

储存条件：所有组分储存于-20 °C。

III. 反转录操作方法

A. 反转录反应

反转录反应可以利用 Oligo(dT)₁₅ 或随机引物随机引物引导。如果需要由 3' Poly(A) 区域引导，选用 Oligo(dT)₁₅ 引物；如果需要引导全长 RNA，选用随机引物。当使用 cDNA 进行克隆及 PCR 反应时，通常选择 Oligo(dT)₁₅ 引物。如果 cDNA 用于 RT-PCR，有时随机引物比较合适，特别当 PCR 引物定位于 RNA 5'-末端时更是如此。

1. 将 1µg(2µl)1.2kb 卡那霉素阳性对照 RNA, Poly(A)+ mRNA 或总 RNA 加入微量离心管中并于 70 °C 温育 10 分钟。短暂离心后置于冰上。
2. 依照所列顺序加入以下试剂以建立一个 20µl 的反应体系。（依据 RNA 的量，反应体积可以增减）：

组分	量
MgCl ₂ , 25mM*	4µl
反转录 10 X 缓冲液	2µl
dNTP 混合物, 10mM	2µl
重组的 RNasin [®] 核糖核酸酶抑制剂	0.5µl
AMV 反转录酶（高浓度）	15u
Oligo(dT) ₁₅ 引物或随机引物	0.5µg
1.2kb 卡那霉素阳性对照 RNA (2µl) 或 Poly(A)+ mRNA 或总 RNA	1µg
加无核酸酶的水至终体积为	20µl**

*推荐的 MgCl₂ 浓度可根据已知序列进行优化以得到较高产量。

**反应组分的终浓度分别为：5mM MgCl₂, 1 X 反转录缓冲液（10mM Tris-HCl [PH 9.0, 25 °C], 50mM KCl, 0.1% Triton[®] X-100), 1mM 每种 dNTP, 1u/µl 重组 RNasin[®] 核糖核酸酶抑制剂, 15u/µg AMV 反转录酶（高浓度），0.5µg Oligo(dT)₁₅ 引物或随机引物/µg RNA, 50ng/µl 1.2kb 卡那霉素阳性对照 RNA, Poly(A)+ mRNA 或总 RNA。

3. 如果使用 Oligo(dT)₁₅ 引物, 将反应体系于 42 °C 温育 15 分钟。如果使用随机引物, 将反应体系于室温温育 10 分钟, 然后于 42 °C 温育 15 分钟。增加的室温温育步骤有利于引物的伸展, 使得当温度升高到 42 °C 时引物仍处于杂交状态。
4. 将样品于 95 °C 加热 5 分钟, 然后于 0-5 °C 放置 5 分钟。这一步将使 AMV 反转录酶失活并阻止其与 DNA 结合。第一链 cDNA 可用于第二链 cDNA 的合成或琼脂糖凝胶分析。如需要 PCR 扩增, 请参照章节 III.B。也可以将第一链 cDNA 存放于 -20 °C 备用。

注意:

1. 建立反应体系前, 将以下试剂根据需要进行分装: 水, 缓冲液, dNTPs, MgCl₂, 重组 RNasin[®] 核糖核酸酶抑制剂。这样做可以减少移液的次数并提高反应的准确性。
2. 可以用特异性下游引物(由使用者提供)代替 Oligo(dT)₁₅ 引物或随机引物。特异性引物的浓度应根据反转录的种类进行调整。例如, 当使用一个 24mer 的引物与 1.0µg 的对照模板 RNA 杂交时, 需要 800ng (100pmol) 引物。当相同的引物与总 RNA 样品中的特异性 RNA 杂交时, 只需要至少 120ng (15pmol) 引物。特异性引物的典型长度为 19-30 个碱基。
3. 为了得到更长和/或更丰富的转录本, 可以将 cDNA 反应于 42°C 温育时间延长至 60 分钟。
4. 在 cDNA 合成时, 与 M-MLV 反转录酶 (Cat.#M1701) 相比, AMV 反转录酶的用量要少很多。
5. 已经证明, 提高反转录的温度 (45-50°C) 可以解决 RNA 二级结构的问题。
6. 本系统提供的 1.2kb 卡那霉素阳性对照 RNA 经 10 倍的系列稀释后已用于扩增反应。使用上述方法我们最少能够检测到 2.5 attomoles 的对照 RNA。

注意: 与使用 Oligo(dT)₁₅ 引物相比, 使用随机引物进行反转录时有不同的温度要求。

B. PCR 扩增反应的稀释

1. 用 TE 缓冲液或无核酸酶的水将第一链 cDNA 合成反应的体积稀释到 100µl。
2. 将下列试剂混合在一起以配制 100µl 扩增反应体系。注意: 模板特异的 上游或下游引物必须在此时加入。

组分	量
第一链 cDNA 反应	10-20µl
dNTP 混合物, 10mM	1.8µl
MgCl ₂ , 25mM*	7.5µl
反转录 10 X 缓冲液**	9.8µl
上游引物	50pmol
下游引物	50pmol
Taq DNA 聚合酶	2.5 单位
加无核酸酶的水至终体积为	100µl***

注意: 如果扩增反应体积较小, 则加入的 cDNA 的量应相应减少。

注意: 本中文操作手册仅供实验参考, 在实际使用中请详细对照原英文技术手册 TB281。如遇到问题请与 Promega 公司北京办事处联系, 免费电话: 8008108133; E-mail: promega@promega.com.cn

技术手册号码: CTB099

*推荐的 MgCl₂ 浓度可根据已知序列进行优化以得到较高产量。

**本系统提供的反转录 10 X 缓冲液可用于 PCR 反应。或者使用 Taq DNA 聚合酶(Cat.#M1661) 提供的缓冲液进行 PCR 反应。

***反应组分的终浓度分别为: ,10ng/μl 第一链 cDNA 反应, 200μM dNTPs, 2mM MgCl₂(包括第一链 cDNA 反应中的), 1 X 反转录缓冲液 (10mM Tris-HCl [PH 9.0, 25 °C], 50mM KCl, 0.1% Triton[®] X-100)。

3. 根据自己的经验使用热循环仪。

IV. 缓冲液及溶液的组成

反转录 10 X 缓冲液 (已提供)		随机引物	
100mM	Tris-HCl (PH 9.0, 25 °C)	0.5μg/μl	Hexamer oligonucleotides
500mM	KCl		
1%	Triton [®] X-100		

V. 相关产品

产品	包装	目录号
Access RT-PCR 系统	100次反应	A1250
	400次反应	A1280
Access RT-PCR Introductory 系统	20次反应	A1260

限实验室使用

PCR产物纯化

产品	包装	目录号
Wizard [®] PCR Preps DNA 纯化系统	50次制备	A7170
Vac-Man [®] 实验室用真空接头, 20 个样品	1	A7231
Vac-Man [®] Jr.实验室用真空接头, 2 个样品	1	A7660

限实验室使用

试剂及 dNTPs

产品	浓度(u/μl)	包装	目录号
Taq DNA 聚合酶(储存缓冲液 B)	5	100u	M1661
	5	500u	M1665
	5	2,500u	M1668
Taq DNA 聚合酶(储存缓冲液 B)	5	100u	M2661
	5	500u	M2665
	5	2,500u	M2668
Taq DNA 聚合酶(储存缓冲液 A)	5	100u	M1861
	5	500u	M1865
	5	2,500u	M1868
Taq DNA 聚合酶(储存缓冲液 A)	5	100u	M2861
	5	500u	M2865
	5	2,500u	M2868
Pfu DNA 聚合酶**	2-3	100u	M7741
	2-3	500u	M7745
Tfi DNA 聚合酶	2-3	100u	M1941
	5	1,000u	M1945
Tii DNA 聚合酶	3	50u	M7101
Tth DNA 聚合酶	5	100u	M2101
	5	500u	M2105

注意: 本中文操作手册仅供实验参考, 在实际使用中请详细对照原英文技术手册 TB281。如遇到问题请与 Promega 公司北京办事处联系, 免费电话: 8008108133; E-mail: promega@promega.com.cn

技术手册号码: CTB099

产品	浓度(u/μl)	包装	目录号
AMV 反转录酶	5-10	300u	M5101
	5-10	1,000u	M5108
AMV 反转录酶 (高浓度)	20-25	600u	M9004
重组 RNasin [®] 核糖核酸酶抑制剂	20-40	2,500u	N2511
	20-40	10,000u	N2515
RNasin [®] 核糖核酸酶抑制剂**	20-40	2,500u	N2111
	20-40	10,000u	N2115

实验室使用

**仅限研究用

产品	包装	目录号
PCR Nucleotide Mix, 10mM	200μl	C1141
	1,000μl	C1145
dATP, 100mM	40μmol	U1201
dCTP, 100mM	40μmol	U1221
dGTP, 100mM	40μmol	U1211
dTTP, 100mM	40μmol	U1231
dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100mM/种	40μmol/种	U1240
dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100mM/种	40μmol/种	U1330
Lambda DNA/ <i>HindIII</i> Markers	100μg	G1711
100bp DNA Ladder	250μl(50 道)	G2101

实验室使用

产品	包装	目录号
PCR Nucleotide Mix, 10mM	200μl	C1141
	1,000μl	C1145
dATP, 100mM	40μmol	U1201
dCTP, 100mM	40μmol	U1221
dGTP, 100mM	40μmol	U1211
dTTP, 100mM	40μmol	U1231
dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100mM/种	40μmol/种	U1240
dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 100mM/种	10μmol/种	U1330
Lambda DNA/ <i>HindIII</i> Markers	100μg	G1711
100bp DNA Ladder	250μl(50 道)	G2101

实验室使用

VI. 参考文献

1. Goodman, H.M. and MacDonald, R.J. (1997) Cloning of hormone genes from a mixture of cDNA molecules. *Meth. Enzymol.* **68**, 75-90.
2. Miller, K. and Storts, D.R. (1995) A sensitive single-tube, two-enzyme system for RT-PCR. *Promega Notes* **53**, 2-5.