

Bestar™ qPCR RT Kit

重要提示：2 管棕色试剂为去除基因组实验专用，使用前请仔细阅读说明书；

一、产品特点：

- 1、本产品采用本公司独特的 Bestar™ MMLV 从 Total RNA 或 Poly(A)⁺ RNA 合成 1st Strand cDNA 的试剂盒，含有 1st Strand cDNA 合成所需的全部试剂。高效的 cDNA 合成能力能够合成 14kb 以上的 cDNA；
- 2、高灵敏度、高适应性
本试剂盒采用了改良型的 MMLV 逆转录酶，提高了 cDNA 合成能力，对于痕量 RNA 模板能够实现良好的 cDNA 合成；
试剂盒对反应条件及 5×RT 缓冲液进行了优化处理，合成的 1st Strand cDNA 可广泛应用于 2nd Strand 合成、杂交、PCR 扩增、Real Time PCR 反应等。
保存：-20℃。

二、试剂盒内容：

标号	试剂盒内容	保存条件	DBI-2220
1	Enzyme Mix (Bestar™ reverse transcriptase + RNase Inhibitor)	-20℃	100ul
2	5× RT Buffer (Reaction Buffer + MgCl ₂ + dNTPs)	-20℃	400ul
3	Primer Mix (Random Primer + Oligo(dT) Primer)	-20℃	100ul
4	RNase -free Water	-20℃	1000ul×2
注意：以下试剂为去除基因组使用，请参考操作说明；			
5	gDNA Remover	-20℃	100ul
6	10× gDNA Remover Buffer	-20℃	200ul

★ 5×RT Buffer

含有反应缓冲液、MgCl₂、dNTPs 等 5 倍浓度的逆转录反应液 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，完全溶解之后再使用。

引物序列：

Oligo(dT)₂₀: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Random Prime: 5'-(dN)₉-3'

需要准备的仪器或试剂：

1. PCR 扩增仪。
2. 电泳用凝胶和电泳用缓冲液。

3. 微量离心机。
4. 微量移液器。
5. 凝胶电泳装置。

三、操作步骤：

(1)RNA 的变性（**注意：此步骤可以根据实验条件选择操作**）；

RNA 在 65℃ 条件 5 分钟后，立即放于冰上冷却。

★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。

★在进行以上步骤处理时，请不要添加 5×RT Buffer 和 **Enzyme Mix**。

(2)-1 逆转录反应液的配制（未使用 **gDNA Remover**）

5×RT Buffer	2μl
RT Enzyme Mix	0.5μl
Primer Mix	0.5μl
RNA	0.5pg-1μg
RNase -free Water	up to 10μl
Total volume	10μl

注意：反应液请直接进行逆转录反应（参考反应条件（3））

(2)-2 反应液的配制（使用 **gDNA Remover**，此步骤可以根据实验条件选择操作）

配置反应液 1：

gDNA Remover	0.5ul
10× gDNA Remover Buffer	1ul
RNA	0.5pg-1μg
RNase -free Water	up to 7μl

去除基因组 DNA 反应条件：

37℃ 5min

反应完成后于冰上冷却，配置逆转录反应液：

5×RT Buffer	2μl
RT Enzyme Mix	0.5μl
Primer Mix	0.5μl
反应液 1 产物	7ul
Total	10μl

★ 除了在本试剂盒内添附的 **Primer Mix** 之外，也可以使用基因特异性引物 (**Gene Specific Primer**)。此时，在反应体系中添加的最终浓度为 **0.5pmol/μl** (每 **10μl** 反应体系添加 **5mpol**)。

(3) 逆转录反应 ((2)-1 或者 (2)-2 逆转录反应液进行以下操作):

在 **37℃** 条件下，进行 **15** 分钟的逆转录反应。



在 **98℃** 条件下，进行 **5** 分钟的逆转录酶失活反应。



反应结束之后，请保存于 **4℃** 或者 **-20℃** 条件下。在进行 **Realtime PCR** 反应时，请在作为模板的反应液内直接添加或者稀释之后添加。

★ 此温度条件是最适合本试剂盒组成成分的条件，一旦改变此温度条件，除了影响酶的活性之外，对引物的退火效率、**RNA** 的清除效率、以及逆转录反应后的酶失活效率等也会产生很大的影响。摸索条件的时候，请一定要基于此温度条件来进行实验。

★ 把逆转录反应液添加到 **Realtime PCR** 反应液内时，请不要超过 **20%** 的量。添加过量的逆转录反应液，会降低 **PCR** 的反应效率，不能进行准确的定量。

★ 在使用基因特异性引物的情况下，特别是使用保持同一配对的逆转录引物和 **PCR** 引物的时候，在逆转录反应时的非特异性退火是导致 **PCR** 非特异性扩增产物产生的原因。此时，提高逆转录反应的温度(至 **42—50℃** 可得到改善)。

注意事项:

为防止 **RNA** 分解酶的污染，在实验中必须采取以下措施:

1. 戴一次性干净手套;
2. 使用 **RNA** 操作专用实验台;
3. 在操作过程中避免讲话等等。
防止实验者的汗液、唾液中 **RNA** 分解酶的污染。
4. 尽量使用一次性塑料器皿，若用玻璃器皿，应在使用前按下列方法进行处理。
 - i. 用 **0.1% DEPC** (焦碳酸二乙酯) 水溶液在 **37℃** 下处理 **12** 小时。
 - ii. 然后在 **120℃** 下高压灭菌 **30** 分钟以除去残留的 **DEPC**。
5. **RNA** 实验用的器具建议专门使用，不要用于其它实验。
6. 用于 **RNA** 实验的试剂，须使用干热灭菌 (**180℃**，**60 min**) 或用上述方法进行 **DEPC** 水处理灭菌后的玻璃容器盛装 (也可使

用 **RNA** 实验用的一次性塑料容器)，使用的无菌水须用 **0.1%** 的 **DEPC** 处理后进行高温高压灭菌。**RNA** 实验用的试剂和无菌水都应专用，避免混用后交叉污染。

使用引物的说明:

- 1、 序列特异性引物
一般情况下，当使用具有和模板 **RNA** 有互补序列的引物时，请事先了解目的片段的序列。
- 2、 **Oligo(dT)₂₀**
只限于在具有 **poly (A) tail** 的 **RNA** 逆转录反应中使用。不适用于原核生物的 **RNA** 以及真核生物的 **rRNA**、**tRNA** 中使用。
- 3、 **Random Primer**
无论是否具有 **poly (A) tail**，一般情况下都可以使用。通过 **Random Primer** 进行逆转录反应时，能够利用任何成对的序列特异的引物进行 **PCR** 反应。通过 **Random Primer** 进行逆转录反应时，为了让引物充分退火，请在 **30℃** 环境中温育 **10** 分钟。

常见问题分析

1. 在 **Realtime PCR** 时检测无信号，或者信号出现延迟。

出现问题	解决方案
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 冻结核保存后再使用，最好每次使用时直接从高浓度的保存液稀释。
RNA的量过多或者过少	经确认，使用本产品时，添加 1pg-2μg 范围的 RNA 的量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。
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	经确认，使用本产品时，即使在 PCR 反应液内添加最多 20% 的逆转录反应液也能表现出良好的反应曲线。但是使用不同的 PCR 试剂，可能会使表达量降低。请减少逆转录反应液的添加量。

2. 在 **Realtime PCR** 时检测到非特异性的信号。

出现问题	解决方案
发生引物的非特异性退火的情况 (使用遗传基因特异性引物时)	使用遗传基因特异性引物进行逆转录时，引物的非特异性退火是在 PCR 时出现非特异性信号的重要因素。提高逆转录反应的温度，可以有效地提高退火的特异性。请把反应温度设定在 42℃-50℃ 的范围内。