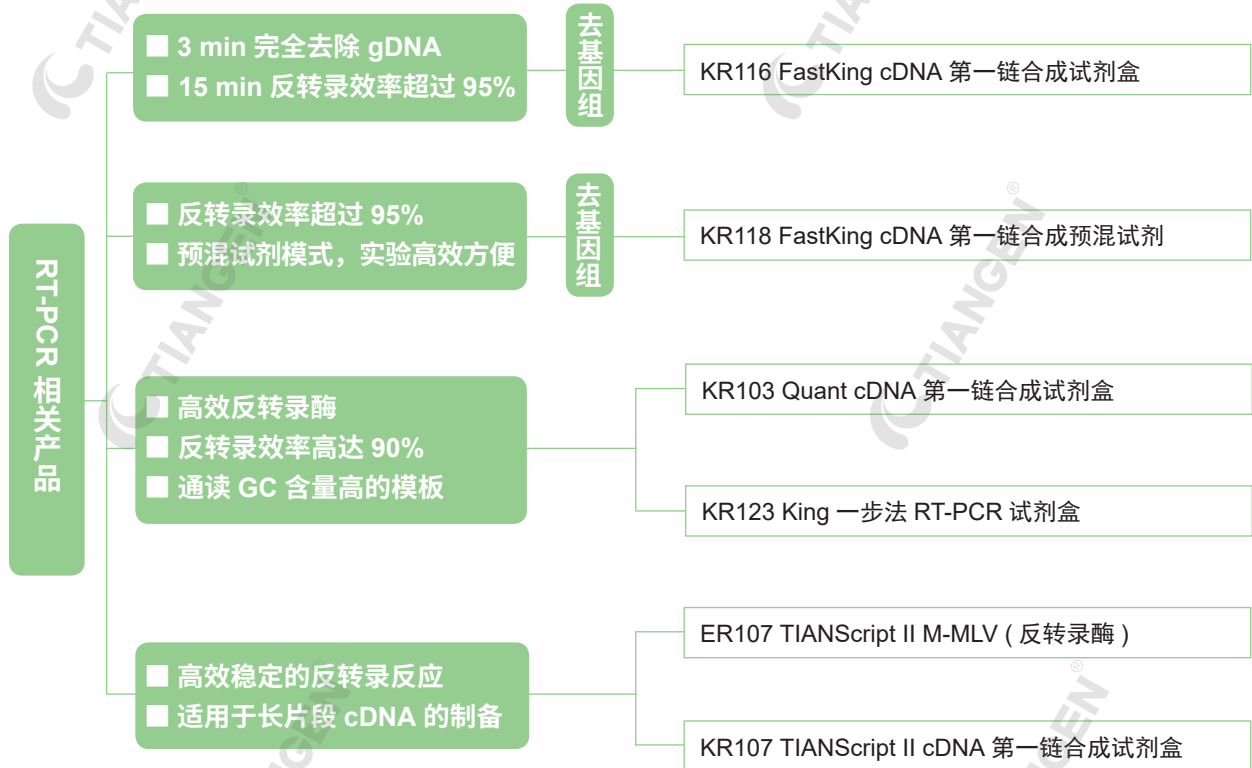


RT-PCR 系列产品选择指南



RT 系列产品选择指南

根据不同的实验要求, TIANGEN 开发了各具特色的 RT 产品, 如完整解决 gDNA 残留问题的反转录试剂 FastKing RT Kit、特别适合长片段反转录的 TIANScript II RT Kit 等。您可以根据自己的实验要求进行相应选择。

产品名称	FastKing RT Kit (With gDNase)	FastKing RT Super Mix	TIANScript II RT kit
目录号	KR116	KR118	KR107
反转效率	★★★★★	★★★★★	★★★★☆
去基因组DNA	+	+	-
反应时间	21 min	18 min	90 min
简便性	★★★★☆	★★★★★	★★★☆☆
复杂模板	★★★★☆	★★★★☆	★★★★★
产物长度	<6 kb	<6 kb	<14 kb
目录价	¥ 1980/100 rxn	¥ 1980/100 rxn	¥ 1680/100 rxn
应用建议	高效制备gDNA-Free cDNA模板, 适用于各类复杂模板和杂质残留模板, 最适于荧光定量PCR检测。	独特Mix配方, 仅需加入模板及引物, 18 min即可同时一步完成基因组去除和反转录。最适于普通RT-PCR及qPCR检测。	对于复杂结构和长片段模板的反转录优势突出。

备注: gDNA残留会对具有高灵敏度特性的荧光定量PCR实验结果产生严重影响, 一定要注意去除干净。

RT-PCR 技术简介

RT-PCR 是将 RNA 的反转录 (RT) 和 cDNA 的聚合酶链式扩增 (PCR) 相结合的技术。首先经反转录酶的作用从 RNA 合成 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 扩增合成目的片段。RT-PCR 技术灵敏而且用途广泛, 可用于检测细胞中基因表达水平, 细胞中 RNA 病毒的含量和直接克隆特定基因的 cDNA 序列。

RT-PCR 体系

模板

作为模板的 RNA 可以是总 RNA、mRNA 或体外转录的 RNA 产物。模板 RNA 最常见的问题是 RNA 降解或混杂有基因组 DNA。使用较好的 RNA 分离方法, 如 RNAPrep Pure 系列 RNA 提取试剂盒, 可以抑制 RNA 酶活性, 并最大限度去除基因组 DNA。如果需要完全去除基因组 DNA, 则应在反转录前用 RNase-Free DNase I 进行处理或选择 KR116 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒。

引物

用于反转录的引物可视实验的具体情况选择随机引物、Oligo dT 及基因特异性引物的一种。对于短的不具有发卡结构的真核细胞 mRNA, 三种引物都可采用。

随机引物	适用于长的或具有发卡结构的 RNA, 特异性最低。经常用于获取 5' 末端序列或从带有二级结构区域的模板获得 cDNA。为了获得最长的 cDNA, 需要按经验确定每个 RNA 样品中引物与 RNA 的比例。随机引物的起始浓度范围为每 20 μ l 反应体系 50-250 ng。
Oligo dT	适用于具有 PolyA 尾巴的 RNA (原核生物的 RNA、真核生物的 rRNA 和 tRNA 不具有 PolyA 尾巴)。由于 Oligo dT 要结合到 PolyA 尾巴上, 所以对 RNA 样品的质量要求较高, 即使有少量降解也会使全长 cDNA 合成量大大减少。建议每 20 μ l 反应体系使用 0.2-0.5 μ M Oligo(dT)。Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ 适用于大多数 RT-PCR。
基因特异性引物 (GSP)	与目的序列互补, 是反义寡聚核苷酸, 适用于目的序列已知的情况。如果目的 RNA 有二级结构, 为避免二级结构阻止引物结合, 应该设计多于一个反义引物。建议在 20 μ l 的第一链合成反应体系中使用 1pmol 基因特异性引物。

反转录酶

一般的反转录酶 (包括 M-MLV 和 AMV) 具有催化 RNA 转化成 cDNA 的聚合酶活性, 同时具有内源 RNaseH 活性。RNaseH 活性会与聚合酶活性相互竞争 RNA 模板与 DNA 引物、RNA 模板与 cDNA 延伸链间形成的杂合链, 并降解 RNA-DNA 复合物中的 RNA 链。被 RNaseH 活性所降解的 RNA 模板不能再作为合成 cDNA 的有效底物, 降低了 cDNA 合成的产量和长度。因此消除或降低反转录酶的 RNaseH 活性将会提高 cDNA 第一链产率。RT-PCR 反应中应选用去除 RNaseH 活性、热稳定性好的反转录酶。

Quant 是一种使用大肠杆菌工程菌进行重组表达的全新高效反转录酶, 其反转录性能明显优于 AMV, M-MLV 系列的反转录酶。该酶与 RNA 具有高亲合性, 可高效转录多种 RNA 模板, 更可通读 GC 含量高、二级结构复杂的 RNA 模板, 适用范围非常广泛。

TIANScrip M-MLV 是由一个 71 kDa 的单亚基组成的 DNA 反转录聚合酶。可以催化以 RNA 或 DNA/RNA 杂交链为模板的互补 DNA 的聚合反应。酶经修饰, RNaseH 的活性比普通的要弱很多, 因此在合成第一链 cDNA 的过程中, RNA 的降解降低, 从而使得率提高。

一步法和两步法

RT-PCR 可以通过一步法或两步法的形式进行:

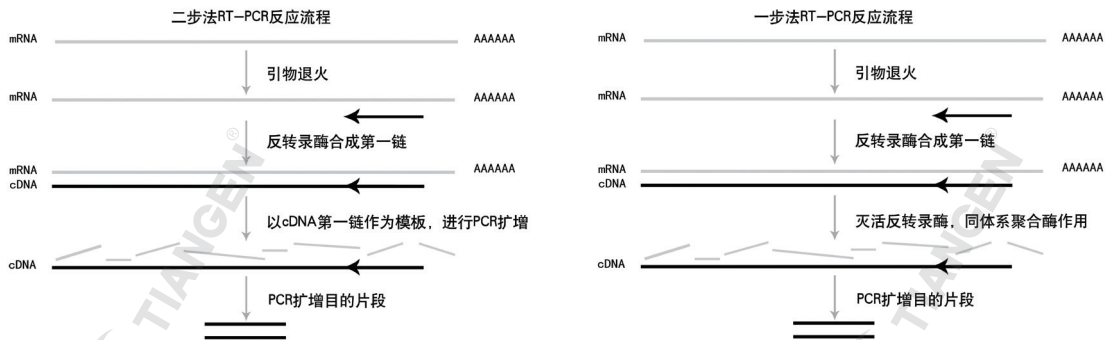
- 一步法即反转录和 PCR 扩增在同一管内完成, cDNA 合成和扩增之间不需要打开管盖, 有助于减少污染。而且由于得到的所有 cDNA 样品都用来扩增, 所以灵敏度更高, 最低可以达到 0.01 μ g 总 RNA。一步法 RT-PCR 一般

使用基因特异性引物起始 cDNA 合成。

- 两步法即反转录和 PCR 扩增分两步进行，首先从 RNA 模板反转录得到 cDNA，得到的 cDNA 再进行一次或多次不同的 PCR 反应。两步法可以使用 Oligo(dT) 或随机引物引导 cDNA 第一链的合成，因此，可以从一个特定的样品中反转录出所有的 mRNA 的信息。
- 一步法更方便，可适用于大量样品分析或定量 PCR。两步法在选择聚合酶和引物时具有更大的灵活性。

根据不同的目的选择不同的系统

目的	建议
RT 与 PCR 使用不同的引物	两步法 RT-PCR 系统
高灵敏度	一步法 RT-PCR 系统
高特异性	含有适当的 DNA 聚合酶的两步法 RT-PCR 系统
高保真度	含有适当的 DNA 聚合酶的两步法 RT-PCR 系统
长的反转录结果	两步法 RT-PCR 系统，使用 Long Taq 进行 PCR 扩增



如何提高 RT-PCR 反应的灵敏度

- 首先应确定模板 RNA 完整性好，无 DNA 污染。
 - 样品取样后应立即提取或放在 RNAstore 样品储存液中保存，以避免 RNA 降解。
 - 采用较好的 RNA 提取方法，如 TRNzol、RNAprep Pure RNA 提取试剂盒，可避免 RNA 降解并最大限度减少 DNA 污染。
- RNA 模板中不应含有扩增反应抑制剂。
 - RNA 模板中若有乙醇、DMSO、SDS 和甲酰胺之类的试剂，都会抑制反转录和 PCR 反应，如果怀疑污染了抑制剂，应首先进行纯化。
- 为了防止模板降解，可以在反应体系中加入 RNase 抑制剂 RNasin(目录号 DP418)。
- 使用适量模板 RNA，模板量太多会降低特异性，太少会导致扩增不出条带或条带太弱。
- 如果由于模板有二级结构，导致扩增效果不好，可提高反转录反应温度。
- 对于 < 50 ng 的 RNA 样品，可以在第一链 cDNA 合成中使用 0.1 μg 到 0.5 μg 乙酰 BSA。
- 镁离子浓度对反应结果影响很大。
 - 可从 1 mM 到 3 mM，间隔 0.5 mM 进行一系列反应，确定对于每个模板和引物对的最佳镁离子浓度。
 - 注意：对实时定量 PCR，使用 3 mM 到 5 mM 的镁离子浓度。
- 设计引物时，避免在引物 3' 端含有互补序列。避免可以形成内部发卡结构的序列。另外，设计时应该考虑设计 Tm 值相近的引物。
- 反应体系尽量不要超过 50 μl，否则可能导致 cDNA 产量降低。

Quant cDNA 第一链合成试剂盒

QuantScript RT Kit

——可对 50 ng-2 μg 总 RNA 进行快速高效的反转录反应

目录号	包装	价格
KR103-03	20 μl × 25 次	1000 元
KR103-04	20 μl × 100 次	3000 元

产品包装

试剂盒组成	25 次 (20 μl 体系)	100 次 (20 μl 体系)
Quant Reverse Transcriptase	25 μl	2 × 50 μl
Oligo(dT) ₁₅ (10 μM)	60 μl	240 μl
Random (10 μM)	60 μl	240 μl
10 × RT mix	50 μl	200 μl
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	2 × 1 ml
Super Pure dNTPs (2.5mM each)	60 μl	240 μl

保存条件

-20℃保存

产品简介

Quantscript RT Kit (cDNA 第一链合成试剂盒) 是专为两步法 RT-PCR 第一步实验配制的。该产品包括了一种全新高效反转录酶 Quant Reverse Transcriptase、反应缓冲液及该实验中必需的反应组分。使用该试剂盒能够以总 RNA 或 mRNA 为模板高效反转录成互补的 cDNA 第一链, 进而开展后继的相关实验。

产品特点

- 反转录效率可达 90%。
- 37℃一步完成整个实验。
- 可通读 GC 含量高、二级结构复杂 RNA 模板。
- 对后继的 PCR 或定量 PCR 实验兼容性好, 适合各种 PCR 耐热聚合酶。

产品应用

- 适合于反转录模板量为 50 ng-2 μg 的总 RNA。
- 实时荧光定量 RT-PCR。
- 半定量 PCR 反应。
- 3' - 和 5' - RACE 等。

FastKing 一步法 RT-PCR 试剂盒

FastKing One Step RT-PCR Kit

—更高效更灵敏的一步法 RT-PCR 试剂

目录号	包装	价格
KR123	50 μ l \times 50 次	1400 元

产品包装

试剂盒组成	50 次 (50 μ l 体系)
2 \times FastKing One Step RT-PCR MasterMix	1.25 ml
25 \times RT-PCR Enzyme Mix	100 μ l
RNase-free H ₂ O	2 \times 1 ml

产品特点

- 纯净：反转录和 PCR 反应一步完成，避免交叉污染
- 高效：独特的 King 反转录酶，反转效率超过 95%
- 灵敏：低至 1 ng 的模板也能被准确识别，特别适合低丰度模板
- 特异：抗体修饰的 Taq 酶，再次提升扩增效率和特异性

下游应用

适用于细胞和组织中的基因表达水平检测，以及克隆特定基因的 cDNA 序列和检测 RNA 病毒。特别适合低丰度模板的定性检测。

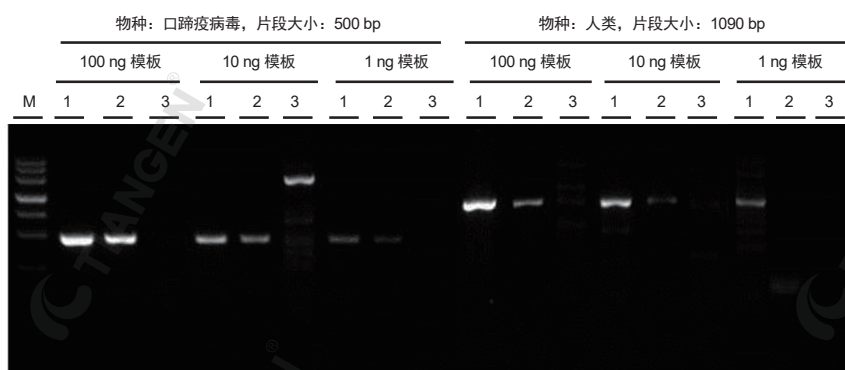
保存条件

-20 $^{\circ}$ C 保存

产品简介

本试剂盒采用一步法使 RT 和 PCR 在同一反应体系中进行，反应过程中不需要添加试剂，无需打开管盖，避免了样品间交叉污染的同时也提高了检测的灵敏度。本试剂盒中的 25 \times RT-PCR Enzyme Mix 为 TIANGEN 新型逆转录酶 (King RTase)、抗体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶和 RNase Inhibitor 的预混 Mix 形式，具有更强的 RNA 亲和性和热稳定性和对复杂二级结构 RNA 模板的延伸能力，以及逆转录后对 cDNA 具有更高的扩增效率和特异性。另外，本产品中的 2 \times FastKing One Step RT-PCR MasterMix 为专门为上述两种关键酶而优化的新型反应体系，其中包含必要离子组分、dNTPs 以及 PCR 稳定剂和增强剂，可保证 King RTase 和 Taq 聚合酶在整个一步法反应过程中发挥最大功效。

实验例



分别提取口蹄疫病毒和人类组织样本的 total RNA，分别使用 TIANGEN KR123 (1)、国外同类产品 A (2) 和国内同类产品 B (3) 反转录和 PCR 不同长度的目的片段，电泳后观察 PCR 结果。结果显示，TIANGEN KR123 条带清晰明亮，无拖尾和非特异扩增，对于 1ng 模板也能较好识别，实验结果优于同类产品。

FastKing cDNA 第一链合成试剂盒 (去基因组)

FastKing RT Kit (with gDNase)

——高效通读各类序列，精确识别低丰度模板

目录号	包装	价格
KR116-01	20 μ l \times 25 次	660 元
KR116-02	20 μ l \times 100 次	1980 元
KR116-03	20 μ l \times 1000 次	17800 元

产品包装

试剂盒组成	25 次 (20 μ l 体系)	100 次 (20 μ l 体系)	1000 次 (20 μ l 体系)
5 \times gDNA Buffer	50 μ l	200 μ l	10 \times 200 μ l
FQ-RT Primer Mix	50 μ l	200 μ l	10 \times 200 μ l
FastKing RT Enzyme Mix	25 μ l	100 μ l	10 \times 100 μ l
10 \times King RT Buffer	50 μ l	200 μ l	10 \times 200 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	2 \times 1 ml	10 \times 2 \times 1 ml

产品特点

- 高效：全新修饰了疏水 motif，反转效率超过 95%
- 灵敏：低至 1 ng 的模板也能被准确识别
- 抗逆：不惧复杂模板，完美抵御杂质干扰
- 快速：21 min 高效制备无基因组残留的 cDNA

下游应用

反转录后的 cDNA 可用于常规 PCR，荧光定量 PCR，cDNA 文库构建，SAGE（基因表达连续分析），引物延伸等多种常规实验。

实验例

基因组去除的必要性

荧光定量实验数据不可用是科研工作者实验中最担心的问题，基因组污染导致的非特异扩增是主要原因之一。

在 2008 年 Nature protocol 的一篇专门针对荧光定量实验研究的文章中明确说明，在进行荧光定量实验的时候需要提前去除基因组污染。

因此在荧光定量之前进行基因组去除步骤，保证实验结果中没有基因组残留带来的潜在威胁，是实验结果是否能通过权威杂志认可的必要条件。

3 min 完全去除 gDNA

全新 gDNase 可高效快速的去除 gDNA，并直接进行反转录实验，无需繁琐的后续 RNA 纯化步骤。

gDNase 突破传统

- 使用方便：为 gDNA Buffer 预混形式，无需单独配制
- 快速高效：3 min 解决 gDNA 污染难题
- 完美兼容：经特殊优化，与 RT 反应完美兼容，无需酚/氯仿抽提纯化，减少 RNA 损失。

产品简介

本试剂盒是一种高效、稳定、快速并可以去基因组 DNA 污染的反转录系统。本试剂盒含有高效去除基因组 DNA 的 gDNase，有效避免 Total RNA 中基因组 DNA 的干扰；高效反转录酶 FastKing RT Enzyme 是通过分子改造后的新型反转录酶，特别增加了疏水 motif，具有更强的 RNA 亲和性和热稳定性，从而进一步提高了其反转录效率和反应速率，并使其在通读 GC 含量高、二级结构复杂的 RNA 模板和抗逆性等方面的表现也更为突出。

保存条件

-20°C 保存

Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method

Thomas D Schmittgen¹ & Kenneth J Livak²

¹Division of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Ohio State University, Parks Hall, 500 West 12th Avenue, Columbus, Ohio, OH 43210 USA; ²Applied Biosystems, 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California, CA 94041 USA. Correspondence should be addressed to T.D.S. (schmittgen.2@osu.edu).

Published online 5 June 2008; doi:10.1038/nprot.2008.73

PROCEDURE

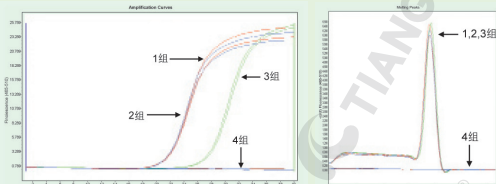
- 1] Isolate RNA as described in Box 1.
 - 2] **Expose the RNA with DNase I as described in Box 2. 明确指出去除基因组的步骤**
 - 3] Synthesize cDNA as described in Box 3.
 - 4] Perform PCR as described in Box 4.
- ▲ **CRITICAL STEP** As stated in the INTRODUCTION, use of the comparative C_T method relies upon the target gene and internal control gene having similar efficiencies.

BOX 2 | DNase TREATMENT

1. Briefly treat the RNA with RNase-free DNase to remove any residual genomic DNA that may be present in the RNA. Prepare the DNase master mix accounting for 1–2 additional reactions.

Ingredient	Per reaction (μ l)	For x reactions (μ l)
RNase-free DNase I (10 U μ l ⁻¹)	1.8	x \times 1.8
RNA guard	0.3	x \times 0.3
25 mM MgCl ₂	2.4	x \times 2.4
Total	4.5	x \times 4.5

2. Add 1.2 μ g of RNA, 4.5 μ l of master mix and water to 30 μ l into 200- μ l PCR strip tubes.
3. Mix by gentle flicking, and briefly spin on a microcentrifuge that can handle strip tubes. Using a PCR Thermal Cycler, incubate at 37 °C for 10 min and then 90 °C for 5 min to inactivate the DNase.



1 组：不去基因组反转录；2 组：不去基因组不反转录；
3 组：去基因组后反转录；4 组：去基因组不反转录。
方法：以 1 μ g Hela 细胞 RNA（有基因组残留）为模板，对 TNF- α 基因（引物设计在外显子上，可以 cDNA 或基因组为模板进行扩增）进行荧光定量 PCR 检测。
结果：如图所示，2 组可反映 RNA 中基因组的残留情况，3 组可准确反映 TNF- α 的真实表达水平，1 组因基因组残留而导致最终定量结果发生错误，4 组表明 KR116 可以完全去除 RNA 中残留的基因组 DNA。

21 min 的“一管式”革命

仅需 21 min 在同一管内完成基因组去除和高效反转录过程，无需更换反应管和独立的 DNase I 处理过程，相对于传统方法 12 步操作所需的 140 min，大大简化了操作步骤，节省了大量操作时间。

继承 King 家族卓越品质

超高的反转录效率

——反转录效率高达 95%

一般的反转录酶其反转录效率在 40-60%，为增加 cDNA 产量，其通过推荐更高的 RNA 上样量来实现，King 反转录酶由于其特有的对于 RNA 模板的高亲和力，使其反转录效率能够达到 95% 以上，所以无需大量上样即可满足后续实验，既节省 RNA，又使得 cDNA 高纯高产。

超强的复杂模板通读能力

——可轻松通读高 GC 和复杂模板

单链 RNA 因链间氢键作用而存在广泛的复杂二级结构区域，普通反转录酶在遇到复杂二级结构时可能会导致反转录的终止，从而无法成功完成 cDNA 的合成。而新一代 King 反转录酶具有独特的结构域，可以破坏 RNA 链间的氢键作用力，从而打开 RNA 的复杂二级结构，保证反转录的正常进行。

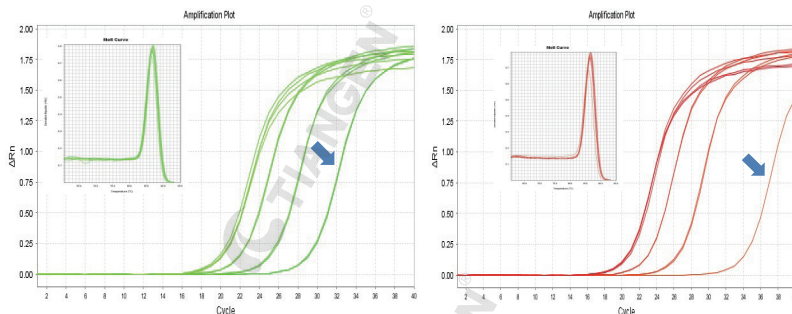
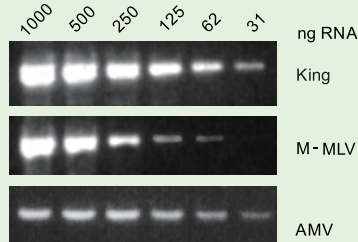
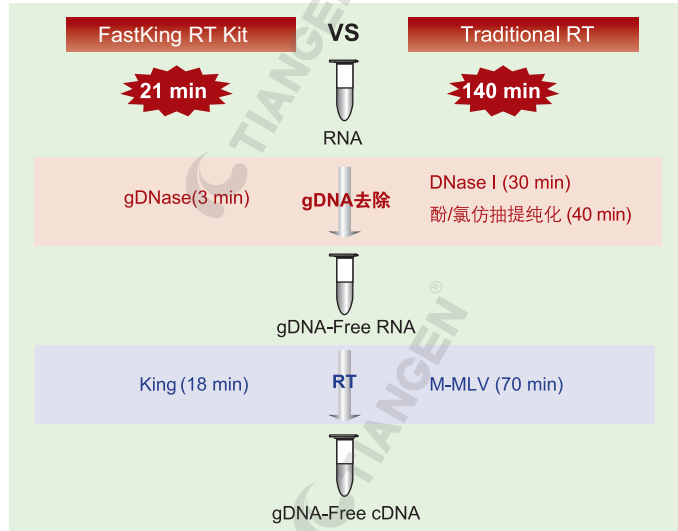
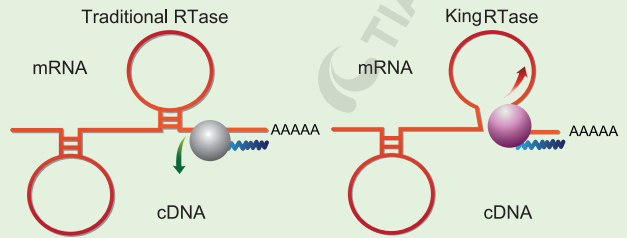


图 1. 使用 TIANGEN FastKing RT kit (KR116, 左) 及国外 A 公司同类产品 (右) 反转录小鼠 RNA, 使用 TIANGEN FP205 进行定量 MM5 基因, 展示扩增曲线和溶解曲线。RNA 使用量分别为 1000 ng, 100 ng, 10 ng, 1 ng。结果显示, TIANGEN KR116 反转录梯度清晰, Ct 值靠前, 并且对于低丰度模板 (1 ng, 蓝色箭头) 的反转录具有明显优势。



不同来源反转录酶的性能比较: 同比无RNaseH活性M-MLV及AMV系列反转录酶, King Reverse Transcriptase 反转录效率有明显优势。

King家族轻松通读复杂模板的秘密



传统反转录酶无法打开复杂二级结构, 反转录酶脱落, 反应终止

King家族反转录酶具有打开二级结构的能力, 可以顺利进行复杂结构区域的反转录

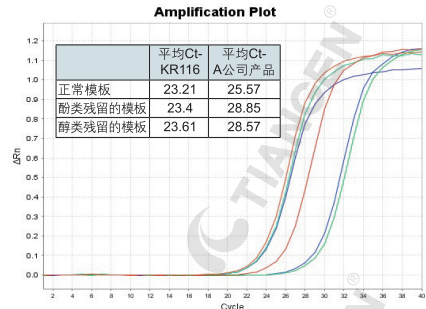


图 2. 使用 TIANGEN FastKing RT kit (KR116) 及 A 公司同类产品分别反转录大鼠的正常 RNA 样本 (红色), 酚类残留量大的 RNA 样本 (绿色), 和醇类残留量大的 RNA 样本 (蓝色), 使用 TIANGEN FP205 进行定量 RNC 基因, 展示扩增曲线和平均 Ct 值。结果显示, TIANGEN KR116 反转录后定量 Ct 值靠前, 并且抗逆性优秀, 对于高杂质残留的模板具有明显优势。

FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂

FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix

— 18 分钟一步搞定去基因组和反转录

目录号	包装	价格
KR118-01	20 μl × 25 次	660 元
KR118-02	20 μl × 100 次	1980 元
KR118-03	20 μl × 1000 次	17800 元

产品包装

试剂盒组成	25 次 (20 μl 体系)	100 次 (20 μl 体系)	1000 次 (20 μl 体系)
5×FastKing-RT SuperMix	100 μl	400 μl	10×400 μl
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	2×1 ml	20×1 ml

产品特点

- 快速：仅需加入模板，18 分钟一步法完成去基因组和高效反转录
- 高效：全新修饰了疏水 motif，反转效率超过 95%
- 灵敏：低至 1 ng 的模板也能被准确识别
- 简洁：独家采用热敏 DNase，见效快，效率高，时间短，不会对 cDNA 产生影响

下游应用

反转录后的 cDNA 可用于常规 PCR，荧光定量 PCR，cDNA 文库构建，SAGE（基因表达连续分析），引物延伸等多种常规实验。

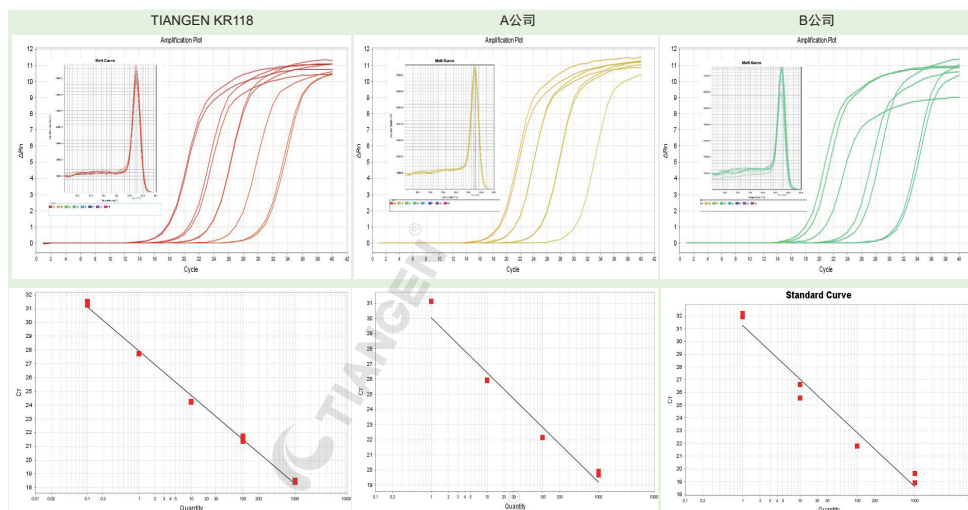
产品简介

本产品是一种高效、稳定、快速并可以去除基因组 DNA 污染的反转录预混 Mix。5× FastKing-RT SuperMix 中不但含有 RT-PCR 中反转录反应所需的所有试剂，还含有高效去除基因组 DNA 的热敏 gDNase。FastKing RT Enzyme 是通过分子改造后的新型反转录酶，在通读 GC 含量高，二级结构复杂的 RNA 模板和抗逆性等方面的表现突出；热敏的 gDNase 生效快，效率高，作用时间短，在处理残留基因组 DNA 之后不会对 cDNA 造成影响。二者结合使用，可使残留基因组的去除与反转录反应同时进行，极大方便了反转录操作。

保存条件

-20℃ 保存

实验例



实验例 1. 分别使用 TIANGEN KR118、国外 A 公司和国内 B 公司的一步法反转录定量试剂合成 cDNA，使用 TIANGEN FP209 检测小鼠 RN5 基因，展示扩增曲线、熔解曲线和标准曲线。结果显示，TIANGEN KR118 反转录得到的 cDNA 量大，扩增 Ct 靠前，特异性高，梯度优秀，特别对于低丰度模板的检测优于其他竞争试剂。

	基因组DNA加入量				
	500 ng	200 ng	100 ng	50 ng	10 ng
KR118	ND	ND	ND	ND	ND
A公司	32.78	35.90	ND	ND	ND
B公司	29.80	31.38	33.33	33.36	37.03
NRT	23.82	25.30	26.60	28.09	35.04

实验例 2. 分别使用 TIANGEN KR118、国外 A 公司和国内 B 公司的一步法反转录定量试剂合成 cDNA，使用 TIANGEN FP209 检测人类 HsG 基因，并且人为添加不同浓度的基因组 DNA，检测不同试剂对基因组 DNA 的去除能力。Ct 结果显示，TIANGEN KR118 具有优秀的基因组 DNA 去除能力，多至 500 ng 的基因组 DNA 残留也能完美去除，不会对结果造成影响。ND：未检出。NRT：不做反转录，直接用混合物定量检测。

TIANScript II cDNA 第一链合成试剂盒

TIANScript II RT Kit

—适用于二级结构复杂和长链 cDNA 的高效合成

目录号	包装	价格
KR107-01	20 μl × 25 次	500 元
KR107-02	20 μl × 100 次	1680 元

产品包装

试剂盒组成	25 次 (20 μl 体系)	100 次 (20 μl 体系)
TIANScript II RTase(200 U/μl)	25 μl	100 μl
Oligo (dT) ₁₅ (10 μM)	60 μl	240 μl
Random (10 μM)	60 μl	240 μl
5× TIANScript II RTase Buffer	150 μl	500 μl
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	2 × 1 ml
Super Pure dNTPs(10 mM, each)	30 μl	120 μl
RNasin (40 U/μl)	15 μl	2 × 30 μl

下游应用

- cDNA 第一链的合成。
- cDNA 文库的构建。
- 一步法 RT-PCR。
- RACE 分析。

保存条件

-20℃保存

产品简介

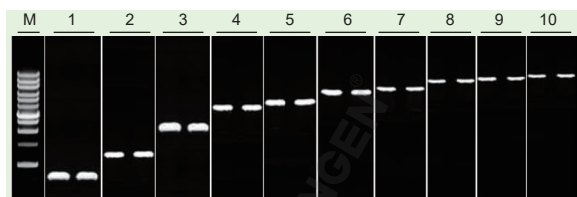
本试剂盒提供了所有的用于 cDNA 第一链合成的试剂，其中的 TIANScript II RTase 为改良后的莫洛尼氏鼠白血病病毒反转录酶 (M-MLV)，改良后的新型 RTase 具有更高的模板亲和力和更低的 RNase H 活性，因此使其在 cDNA 第一条链的合成过程中具有通读复杂二级结构模板和反转录长片段 cDNA 的能力。产品中配备的 5× TIANScript II RTase Buffer 经过精心的优化，既保证了新型 RTase 的高效酶活，又拓宽了 RNA 模板量的加入范围，使得反转录出来的 cDNA 具有更好的质量以用于后续的实验分析。

产品特点

- 酶活效率高：高效的反转录酶活性，后续实验兼容性好。
- 底物范围广：适用于所有 RNA，尤其是具有复杂二级结构的 RNA 模板。
- 反转片段长：cDNA 第一链合成可以达到 12 kb。
- 操作简单：只需一步添加所需成分，无需中间加入任何试剂。

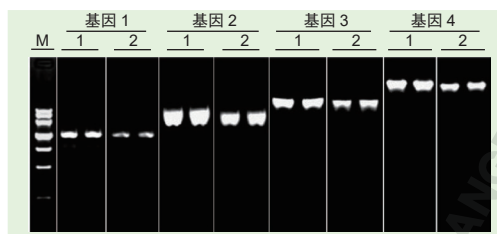
实验例

TIANScript II cDNA 第一链合成试剂盒不同长度片段的反转录能力



实验材料：人类贴壁细胞总 RNA。
RT-PCR 起始量：2 μl 反转录产物 (50 ng/μl)
实验方法：反转录：参照 KR107 说明书进行操作。
实验结果：以上为 1 μg 总 RNA 反转录后取 2 μl 反转录产物进行 10 个长度不同的目标基因的扩增图。
扩增体系 (PCR)：20 μl；上样量：5 μl；
Marker：D15000+1kb DNA Ladder；胶浓度：1%；
电泳条件：6 V/cm，20 min
各泳道图示：M：DNA Marker； 1：产物长度 120 bp；
2：产物长度：1 kb； 3：产物长度：2.5 kb；
4：产物长度：3.2 kb； 5：产物长度：4.6 kb；
6：产物长度：6.8 kb； 7：产物长度：7.6 kb；
8：产物长度：8.9 kb； 9：产物长度：10 kb；
10：产物长度：12 kb。

TIANScript II cDNA 第一链合成试剂盒与其他公司产品在长片段模板反转录过程中，效率和特异性的对比



实验材料：人类贴壁细胞总 RNA。
RT-PCR 起始量：2 μl 反转录产物 (50 ng/μl)
实验方法：反转录：参照 KR107 说明书进行操作。
实验结果：以上为 1 μg 人类贴壁细胞总 RNA 为模板，同时使用某进口品牌 M-MLV 和 TIANScript II RT Kit 反转录后进行 6 个长度不同的目标基因的扩增对比图。
扩增体系 (PCR)：20 μl；上样量：5 μl；
Marker：DNA MarkerIII；胶浓度：1%；
电泳条件：6 V/cm，20 min。
各泳道图示：M：DNA Marker；1：TIANScriptII RT Kit 反转录 cDNA 的扩增结果；2 进口同类产品反转录 cDNA 的扩增结果；基因 1 产物长度 1.3 kb；基因 2 产物长度 3.0 kb；基因 3 产物长度 5.0 kb；基因 4 产物长度 7.5 kb；

Q&A RT-PCR 常见问题分析

Q 少量或没有 RT-PCR 产物

A-1 RNA 被降解

——分离无污染、高质量的 RNA；提取 RNA 的材料要尽量新鲜，防止 RNA 降解；RT 反应前，在变性胶上分析 RNA 的完整性。RNA 提取后，应储存在 100% 甲酰胺中，如果使用 RNase 抑制剂，加热时小于 45°C；pH 小于 8.0，否则抑制剂会释放所有结合的 RNase。而且，在 ≥ 0.8 mM DTT 时加入 RNase 抑制剂，一定要存在 DTT。

A-2 RNA 中包含反转录反应的抑制剂

——反转录抑制剂包括 SDS, EDTA, 甘油, 焦磷酸钠, 亚精胺, 甲酰胺和胍盐等。将对照 RNA 和样品混合，与对照 RNA 反应比较产量，以检验是否有抑制剂。通过 70% (v/v) 乙醇对 RNA 沉淀进行清洗，除去抑制剂。

A-3 用于合成 cDNA 第一链合成的引物的退火不充分

——确定退火温度适合实验中所用的引物。对于随机六聚体，建议在反应温度保温之前先在 25°C 保温 10 min。对于基因特异性引物 (GSP)，可以试一下其他 GSP，或换用 oligo(dT) 或随机六聚体。

A-4 起始 RNA 量较少

——增加 RNA 的量。对于小于 50 ng 的 RNA 样品，可以在第一链 cDNA 合成中使用 0.1 μ g 到 0.5 μ g 乙酰 BSA。

A-5 目的序列在分析的组织中不表达

——尝试其他组织。

A-6 PCR 反应失败。

——对两步法 RT-PCR，在 PCR 步骤中的 cDNA 模板不能超过反应体积的 1/5。

Q 产物有非特异性条带

A-1 引物和模板的非特异性退火

——避免引物 3' 端含有 2 到 3 个 dG 或 dC。在第一链合成中使用基因特异性引物，而不是随机引物或 oligo(dT)。在开始几个循环使用较高的退火温度，然后使用较低的退火温度。使用热启动 Taq DNA 酶进行 PCR，提高反应的特异性。

A-2 基因特异性引物设计较差

——遵循用于扩增引物设计的同样原则。

A-3 RNA 中有基因组 DNA 的污染

——使用扩增级 DNase I 处理 RNA。设置没有反转录的对照反应检测 DNA 污染。

A-4 形成引物二聚体

——设计在 3' 端没有互补序列的引物。

A-5 镁离子浓度太高

——对于每一个模板和引物组合优化镁离子浓度。

A-6 沾染外源 DNA

——使用抗气雾剂的吸头和 UDG 酶。

Q 产生弥散 (smear) 条带

A-1 第一链产物的含量过高

——常规 PCR 反应步骤中减少第一链产物的量。

A-2 PCR 反应中引物过多

——减少引物的用量。

A-3 循环数过多

——优化 PCR 反应条件，减少 PCR 的循环次数。

A-4 退火温度过低

——提高退火温度，防止非特异性的起始及延伸。

A-5 DNase 降解 DNA 使产生的寡核苷酸片段产生的非特异性扩增

——提取高质量 RNA，防止被 DNA 污染。

Q 反转录 RT-PCR 的引物如何选择?

A-1 RT-PCR 就是将 RNA 先反转录为 cDNA, 再将反转录得到的 cDNA 作为模板进行 PCR 反应扩增目标片段。用于反转录的引物根据实验的具体情况选择随机引物、Oligo dT 及基因特异引物的一种。对于短的不具有发卡结构的真核细胞 mRNA 三种引物都可。

随机引物: 适用于长的具有发卡结构的 RNA。适用于 rRNA、mRNA、tRNA 等所有 RNA 的反转录反应。主要用于单一模板的 RT-PCR 反应。

Oligo dT: 适用于具有 PolyA 尾巴的 RNA。(原核生物的 RNA、真核生物的 Oligo dT rRNA 和 tRNA 不具有 PolyA 尾巴。)由于 Oligo dT 要结合到 PolyA 尾巴上, 所以对 RNA 样品的质量要求较高, 即使有少量降解也会使全长 cDNA 合成量大大减少。

基因特异引物: 与模板序列互补, 适用于目的序列已知的情况。

Q 如何证明 RNA 反转录 cDNA 第一链成功?

A-1 可以有两方法:

1、内参法: 理论上, cDNA 是长短不一的 DNA 片断, 所以电泳的结果是模糊一片的, 如果 RNA 丰度低, 电泳也可能是无产物, 但是这种情况不代表 PCR 会无结果。检测 cDNA 一般可以用内参, 内参有结果, cDNA 的质量基本上可以保证(少数情况下: 如目的基因片段过长, 可能会有例外)。

2、如果有已知以此模板扩出来的基因, 可以用此基因的引物验证。能扩增出内参, 不一定就说明 cDNA 没有问题。因为内参在 cDNA 中丰度高, 很容易扩出。如果 cDNA 因为各种原因导致部分降解, 从机率的角度讲, 就会大大影响低丰度的目的基因的 PCR 结果, 而内参因为依然是高丰度, 扩增很可能不受影响。

Q RT-PCR 可以扩出内参基因而扩不出目的基因

A-1 RNA 部分降解, 检测提取 RNA 的完整性及纯度

不同物种的 RNA 情况可能不一样, 但一般来说抽提成功的总 RNA 在凝胶电泳中应包含两条清晰的 28S 和 18S 条带, 并且前者条带的亮度应是后者的 2 倍, 出现 5S 带代表 RNA 发生了降解, 其亮度与降解程度成正比。内参扩的好不能说明 RNA 没有问题, 因为内参的表达量大, 只要是 RNA 降解的不严重都可以扩出来。分光光度计测的纯 RNA 的 OD260/OD280 的比值应位于 1.9-2.1 之间, 提取 RNA 的时候吸入少量蛋白会使比值降低, 只要不是降的太多就不会影响 RT, 最重要的是 RNA 的完整性。

Q RT 是否成功?

A-1 内参基因能扩出来, 仅仅只能说明 RT 成功了, 而与 cDNA 一链的质量没有必然的联系。因为内参片段大小一般都比较小, 而且表达量也比较高, 在反转录时比较容易成功。而目的基因因“基因”而异, 大小与表达量都存在很大的不同。特别是长于 2 kb 的目的片段, 更不能仅仅根据内参来判断 cDNA 质量; 有些样品带有复杂的二级结构, 或者富含 GC, 或者有些样品很珍贵量很少, 这时要根据目的片段大小和样品的情况选择合适的反转录酶。对于 GC 含量高, 二级结构复杂的 RNA 模板, 低温很难将二级结构打开, 使用普通的反转录酶很难奏效, 此时可以选择 Quant Reverse Transcriptase, 其反转录性能明显优于 M-MLV 系列的反转录酶, 该酶能够高效反转录多种 RNA 模板, 最大限度将 RNA 转录成 cDNA 第一链; 一般的反转录酶 kit, 20 μ l 体系只能有效反转录 1 μ g 总 RNA。应注意 kit 的最高容量是多少, 如果模板加入过量, 反转录会偏向一些丰度高的 RNA。所以最好还是不要超过体系的最大容量。

Q PCR 反应是否成功

A-1 内参只能说明模板 cDNA 是有效的, 但即便是质量很好的组织 cDNA 模板, 也不能保证可以很好的扩增出目的基因, 这还取决于该基因在该组织 cDNA 中正常表达量的多少。应检查所用模板的该目的基因的表达量或者重新抽提 RNA, 以找到高表达目的基因的组织或细胞; 如果目的片段的 PCR 产物连二聚体都没有, 可以考虑是引物的问题, 可以加大引物量或尝试用特异性引物进行反转录, 即用下游引物替换随机引物进行反转录, 反转录的条件与反转录酶活性有关, 所以可以不需要改变; 另外, 内参基因很容易扩出, 内参基因的扩增条件不一定适合于目的基因, 应根据设计的引物就 PCR 条件进行摸索。若常规 PCR 无法扩出目的基因, 可以考虑进行降落和热启动 PCR。

Q RT-PCR 无法扩出内参基因**A-1** RNA 是否降解严重以及 RT 是否成功

一般情况下, 出现内参都扩不出来很多时候都是 RNA 降解严重导致的。另一个可能原因是反转录失败。内参不能作为判断 cDNA 一链质量的标准, 但在 RNA 质量没问题的情况下却可以作为判断反转录是否成功的标准。反转录过程最重要的是保持恒定的温度和恒定的反应体系, 以提高反应效率。

A-2 扩增内参基因的引物是否可靠以及 PCR 所用的试剂有无问题**Q 检测 RNA 水平进行相对定量时, 是否需要在各样本 RNA 浓度一致的情况下再反转录成 cDNA ?**

A-1 做相对定量时, 必须首先在反转录前对 RNA 进行定量, 这也是很多反转录试剂盒中所要求的, 如 RNA 的量为 1 μg 。由于反转录后的 cDNA 是一种混合液, 包括未完成反应的 RNA、oligo dT、酶、dNTP、甚至还可能残留少许的 DNA 等等, 都会造成偏差, 因此无法对 cDNA 进行准确定量, 这就需要对 RNA 进行定量, 认为不同样本间的反转录效率相同, 因此获得的 cDNA 量也相同, 进而进行定量分析, 其结果表示在相同量的总 RNA 中, 不同基因的表达倍数关系。做相对荧光定量 PCR 时, 反转录后可不用定量 cDNA, 因为有内参基因做参考。

Q 长片段的反转录 PCR 是否可行?

A-1 主要和基因本身有关, 对于大多数基因是不可行的, 首先反转录的效率远远低于 PCR 的效率, 其次很多基因的 GC 富含区和二级结构同时限制了反转录和 PCR, 最后就是 PCR 的保真度和扩增效率, 二者很难同时保证。在反转录过程中, 对于低拷贝基因谁也不能保证拿到长的基因, 尤其采用 oligo(dT), 至于 5' UTR 的 GC 更多, 就更加困难。因此采用随机引物反转录, 寻找目的片段内的天然酶切位点, 分段扩增, 最后进行酶切连接还是较为合理的方法。一般情况下, 直接扩增 2 kb 以上的片段就已经很困难, 但并不是就一定拿不到:

1. 首先保证 RNA/mRNA 的完整性, 最好用 TRNzol 来提取;
2. 可以应用 M-MLV RT-PCR 试剂盒直接做, 在扩增的过程中适量延长退火的时间的同时增加循环数; 或者采用巢式 PCR, 也可以先进行一两个反应, 把变性和延伸时间适当延长一些再进行正常的 PCR 扩增, 可能有助于扩出片段, 不过要注意酶的保真性;
3. 在 PCR 过程中应用 Long Taq 可获得比较理想的结果;
4. 如果需要作表达, 应考虑应用高保真酶。

Q Quant Reverse Transcriptase 的产品特点以及与 TIANScript M-MLV 的区别。

A-1 TIANGEN 的反转录酶有两种: Quant RTase 和 TIANScript M-MLV, 两者的主要区别是针对的模板量不同。Quant 是一种独特的反转录酶, 与通常使用的 Moloney 鼠白血病病毒来源的 M-MLV 不同, 是一种使用大肠杆菌工程菌进行重组表达的全新高效反转录酶, 适合扩增 50 ng-2 μg 的 RNA, 反转录活性高, 产率高。与普通的 MMLV 或 AMV 相比, Quant 最大的特点就是与 RNA 模板的亲合力非常强, 不需要高温变性即可进行复杂模板的反转, 对于较高 GC 含量的模板, 反转效率更高。但这种反转录酶是有 RNase H 活性的, 可能会对 cDNA 产物的长度有一定影响 (适于 < 4.5 kb 的模板)。对于常规的反转录来说, 可以选择 TIANScript MMLV 反转录酶, 这个酶经过修饰, RNase H 活性很弱, 适用于较长 (>5 kb) 的 cDNA 合成。

Q 如何选择采用一步法还是两步法进行 RT-PCR?

A-1 一步法即反转录和 PCR 扩增在同一管内完成, 在 cDNA 合成和扩增之间不需要打开管盖, 有助于减少残余污染。由于得到的所有 cDNA 样品都用来扩增, 所以灵敏度更高, 最低可以达到 0.01 pg 总 RNA。对于成功的一步法 RT-PCR, 一般使用基因特异性引物起始 cDNA 合成。

两步法即反转录和 PCR 扩增分两步进行, 首先从 RNA 模板反转录得到 cDNA, 得到的 cDNA 再进行一次或多次不同的 PCR 反应。两步法可以使用 oligo(dT) 或随机引物引导 cDNA 第一链的合成, 可以从一个特定的样品中反转录出所有 mRNA 的信息。

总的来说，一步法更方便，可适用于大量样品分析或定量 PCR。两步法在选择聚合酶和引物时具有更大的灵活性。但需要注意的是，一步法中由于反转录与 PCR 反应在同一反应体系中进行，使用同一反应 buffer，两者反应条件不能同时得到优化，且反转录步骤在一些 PCR 反应 buffer 中效率很低，因此一般不推荐使用。

目的	建议
RT 与 PCR 使用不同的引物	两步法 RT-PCR 系统
高灵敏度	一步法 RT-PCR 系统
高特异性	含适当的 DNA 聚合酶的两步法 RT-PCR 系统
高保真度	含适当的 DNA 聚合酶的两步法 RT-PCR 系统
长的反转录结果	两步法 RT-PCR 系统，使用 Long Taq 进行 PCR 扩增

部分使用 TIANGEN RT-PCR 产品发表的文献列表

题目	期刊	IF	使用产品	单位
Molecular architecture of lineage allocation and tissue organization in early mouse embryo	Nature	43.07	FastQuant	中科院上海生化细胞所
Genome-wide screening for functional long noncoding RNAs in human cells by Cas9 targeting of splice sites	Nature Biotechnology	31.864	RNA 提取 / QuantScript	北京大学
Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs	Nature Biotechnology	31.864	RNA 提取 / QuantScript	北京大学
Slc6a8-Mediated Creatine Uptake and Accumulation Reprogram Macrophage Polarization via Regulating Cytokine Responses	Immunity	21.522	TIANScript	清华大学
Tom20 senses iron-activated ROS signaling to promote melanoma cell pyroptosis	Cell Research	17.848	RNA 提取 / FastQuant	厦门大学
Distinct enhancer signatures in the mouse gastrula delineate progressive cell fate continuum during embryo development	Cell Research	17.848	FastQuant	中科院上海生化细胞所
Derepression of co-silenced tumor suppressor genes by nanoparticle-loaded circular ssDNA reduces tumor malignancy	Science Translational Medicine	17.161	FaskKing	南开大学
The Nuclear Matrix Protein SAFA Surveils Viral RNA and Facilitates Immunity by Activating Antiviral Enhancers and Super-enhancers	Cell Host & Microbe	15.753	RNA 提取 / FastKing	北京大学医学部
Cryptococcus neoformans sexual reproduction is controlled by a quorum sensing peptide	Nature Microbiology	14.3	FastQuant	中科院微生物所
Generation of self-compatible diploid potato by knockout of S-RNase	Nature Plants	13.297	RNA 提取 / FastQuant	云南师范大学
Fear extinction requires ASIC1a-dependent regulation of hippocampal-prefrontal correlates	Science Advances	12.804	FastQuant	上海交通大学医学院
TSPAN15 interacts with BTRC to promote oesophageal squamous cell carcinoma metastasis via activating NF-κB signaling	Nature Communications	11.878	FaskKing	中山大学肿瘤中心
Sensing of cytosolic LPS through casp2 pyrin domain mediates noncanonical inflammasome activation in zebrafish	Nature Communications	11.878	RNA 提取 / FastKing/SuperReal	华东理工大学
Identifying and characterizing SCRaMbLED synthetic yeast using ReSCuES	Nature Communications	11.878	FastQuant/SuperReal	中科院深圳先进技术研究院
Oncogenic potential of truncated RXRα during colitis-associated colorectal tumorigenesis by promoting IL-6-STAT3 signaling	Nature Communications	11.878	TIANScript	厦门大学

题目	期刊	IF	使用产品	单位
An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nature Communications	11.878	FastKing/ SuperReal	香港城市大学
Adiponectin receptor PAQR-2 signaling senses low temperature to promote <i>C. elegans</i> longevity by regulating autophagy	Nature Communications	11.878	QuantScript	云南大学
Maintenance of translational elongation rate underlies the survival of <i>Escherichia coli</i> during oxidative stress	Nucleic Acids Research	11.147	RNA 提取 / FastKing	华中师范大学
H2A.Z.1 crosstalk with H3K56-acetylation controls gliogenesis through the transcription of folate receptor	Nucleic Acids Research	11.147	DNA 提取 / FastQuant/SuperReal	中科院动物所
A PIF7-CONSTANS-Centered Molecular Regulatory Network Underlying Shade-Accelerated Flowering	Molecular Plant	10.812	RNA 提取 /FastQuant	复旦大学
LORELEI-LIKE GPI-ANCHORED PROTEINS 2/3 Regulate Pollen Tube Growth as Chaperones and Coreceptors for ANXUR/BUPS Receptor Kinases in Arabidopsis	Molecular Plant	10.812	FastQuant	华东师范大学
A GmNINa-miR172c-NNC1 Regulatory Network Coordinates the Nodulation and Autoregulation of Nodulation Pathways in Soybean	Molecular Plant	10.812	RNA 提取 /FastKing	华中农业大学
RECEPTOR-LIKE KINASE 902 Associates with and Phosphorylates BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1 to Regulate Plant Immunity	Molecular Plant	10.812	FastQuant	福建农林大学
Paracrine and epigenetic control of CAF-induced metastasis: the role of HOTAIR stimulated by TGF- β 1 secretion	Molecular Cancer	10.679	FastQuant/SuperReal	天津医科大学
Reverse Evolution of a Classic Gene Network in Yeast Offers a Competitive Advantage	Current Biology	9.193	FastQuant	中科院微生物所
Probing the Function of Metazoan Histones with a Systematic Library of H3 and H4 Mutants	Developmental Cell	9.19	RNA 提取 /FastQuant	上海科技大学
Compression Generated by a 3D Supracellular Actomyosin Cortex Promotes Embryonic Stem Cell Colony Growth and Expression of Nanog and Oct4	Cell Systems	8.64	FastQuant/SuperReal	清华大学
Organic cation transporter 3 (Oct3) is a distinct catecholamines clearance route in adipocytes mediating the beiging of white adipose tissue	PLOS Biology	8.386	DNA 提取 /FastKing	清华大学
MORC2 regulates C/EBP α -mediated cell differentiation via sumoylation	Cell Death and Differentiation	8.086	RNA 提取 /FastKing	沈阳中国医科大学
JOSD1 inhibits mitochondrial apoptotic signalling to drive acquired chemoresistance in gynaecological cancer by stabilizing MCL1	Cell Death and Differentiation	8.086	QuantScript	协和医学院
Circular RNA cESRP1 sensitises small cell lung cancer cells to chemotherapy by sponging miR-93-5p to inhibit TGF- β signalling	Cell Death and Differentiation	8.086	FastQuant/Talent	南方医科大学珠江医院
The Schizophrenia Susceptibility Gene OPCML Regulates Spine Maturation and Cognitive Behaviors through Eph-Cofilin Signaling	Cell Reports	7.815	QuantScript	北京大学第六附属医院
Expanded Expression Landscape and Prioritization of Circular RNAs in Mammals	Cell Reports	7.815	FastKing	中科院北京生命科学研究所
From Hyper- to Hypoinsulinemia and Diabetes: Effect of KCNH6 on Insulin Secretion	Cell Reports	7.815	DNA 提取 /RNA 提取 /FastQuant	首都医科大学附属同仁医院