

## BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)

产品编号	产品名称	包装
D7168S	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	20次
D7168M	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	100次
D7168L	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	500次

### 产品简介:

- 碧云天生产的 BeyoRT™ II cDNA 第一链合成试剂盒(RNase H-), 即 BeyoRT™ II First Strand cDNA Synthesis Kit (RNase H minus), 是一种采用了经过改造和优化的 BeyoRT™ II M-MLV 反转录酶(RNase H-), 用于以总 RNA、mRNA 等为模板反转录合成 cDNA 第一链的试剂盒。本试剂盒包含了进行 cDNA 第一链合成所需的各种试剂。
- 使用本试剂盒合成的第一链, 可以直接用于后续的常规 PCR、real-time PCR 也称定量 PCR(quantitative PCR, qPCR)、cDNA 的第二链合成以及 cDNA 文库的构建等。
- 使用本试剂盒可以轻松完成长度为 8 kb 及以下基因的反转录(参考图 1), 反转录的最大长度可以超过 10 kb。在采用 BeyoRT™ II M-MLV 反转录酶(RNase H-)的情况下, 由于缺失了 RNase H 酶活性, RNA 和 DNA 双链复合物中的 RNA 不会被降解, 这样反转录出来的 cDNA 的长度就会更长, 并且产量更高。

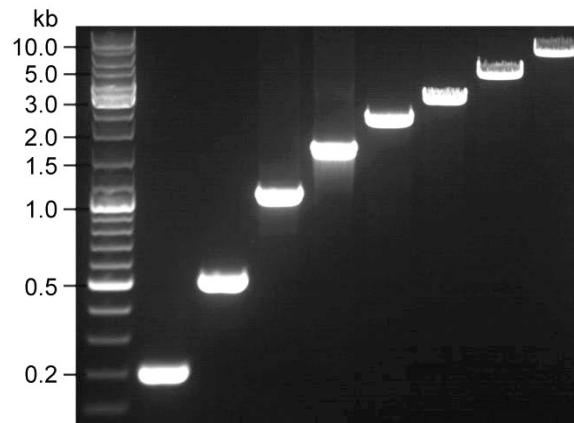


图1. 使用本试剂盒对总RNA反转录后, 对于不同长度的cDNA进行PCR扩增后的电泳效果图。图中可见对于0.2-8kb的cDNA可以非常高效地被反转录。

- 本试剂盒中的 BeyoRT™ II M-MLV 反转录酶(RNase H-)热稳定性高, 最适反应温度为 42-45°C, 但当温度达到 50°C 时仍具有很高活性, 且可获得较高产量的 cDNA。
- 试剂盒中提供了 RNase Inhibitor, 确保在反转录过程中的 RNA 不会被 RNA 酶所降解并取得较好的反转录效果。
- 试剂盒还提供了 Oligo(dT)<sub>18</sub> 和 random hexamer 这两种引物, 前者适合用于带有 Poly(A)尾的 mRNA 的反转录, 后者进行反转录时不需要 poly(A)尾。也可以自行采用基因特异性引物进行 cDNA 第一链的合成。
- 用于体积为 20 微升的 cDNA 第一链合成反应时, 不同包装的本试剂盒足够分别进行 20 个, 100 个以及 500 个 cDNA 第一链样品的合成。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7168S-1	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	20μl
D7168S-2	Reaction Buffer (5X)	0.1ml
D7168S-3	RNase Inhibitor (20U/μl)	20μl
D7168S-4	dNTP Mix (10mM each)	40μl
D7168S-5	Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer (0.5μg/μl)	20μl
D7168S-6	Random Hexamer Primer (0.2μg/μl)	20μl
D7168S-7	DEPC-treated Water	0.3ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7168M-1	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	100µl
D7168M-2	Reaction Buffer (5X)	0.5ml
D7168M-3	RNase Inhibitor (20U/µl)	100µl
D7168M-4	dNTP Mix (10mM each)	200µl
D7168M-5	Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer (0.5µg/µl)	100µl
D7168M-6	Random Hexamer Primer (0.2µg/µl)	100µl
D7168M-7	DEPC-treated Water	1.5ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7168L-1	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	500µl
D7168L-2	Reaction Buffer (5X)	2.5ml
D7168L-3	RNase Inhibitor (20U/µl)	500µl
D7168L-4	dNTP Mix (10mM each)	1ml
D7168L-5	Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer (0.5µg/µl)	500µl
D7168L-6	Random Hexamer Primer (0.2µg/µl)	500µl
D7168L-7	DEPC-treated Water	7.5ml
—	说明书	1份

#### 保存条件：

-20°C保存。

#### 注意事项：

- 对于GC含量比较高的RNA的反转录，产品的使用说明中都给予了特别说明，请予以关注。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明：

##### 1. cDNA第一条链的合成(First-stand cDNA Synthesis):

a. 参考如下表格设置反转录反应(RNase Inhibitor (R0102)和dNTP mix (D7373)可从碧云天订购):

模板（右侧3种任选其中一种）	Total RNA	0.1 ng-5 µg
	或poly (A) RNA/mRNA	10 pg-0.5 µg
	或specific RNA	0.01 pg-0.5 µg
引物（右侧3种任选其中一种）	Oligo (dT) <sub>18</sub> primer	1 µl
	或 Random Hexamer primer	1 µl
	或 gene-specific primer	15-25 pmol
DEPC-treated Water	-	To 12 µl*
<b>选择性步骤：</b> 如果模板RNA的GC含量较高(例如大于55%)或者有比较严重的二级结构，混匀后微离心以把液体沉降至管底，65°C孵育5min，随后立即置于冰上冷却，以打开RNA中一些比较稳定的二级结构。		
Reaction Buffer (5X)	-	4 µl
RNase Inhibitor (20U/µl)	-	1 µl
dNTP Mix(10mM each)	-	2 µl
BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	-	1 µl
总体积		20 µl

\*To 12µl表示加入DEPC-treated Water至最终体积为12µl。

- 轻轻混匀(用移液器轻轻吹打混匀或用涡旋混合器在最低速度轻轻混匀)，随后离心沉淀液体。
- 如果使用Oligo(dT)<sub>18</sub>或基因特异性引物，42°C孵育60 min。如果使用random hexamer(随机六聚体)作为引物，先在25°C孵育10 min，随后在42°C孵育60 min。**注意：**对于GC含量较高或二级结构比较严重的模板RNA，可以50°C孵育60 min，以充分利用本产品中的反转录酶在50°C时仍有良好活性这一特点，在较高温度进行反转录可以有效减少二级结构的干扰。
- 80°C孵育10 min以失活BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)并终止反转录反应。**说明：**对于5kb以上的长片断cDNA不推荐采用加热的方法失活反转录酶，该方法易导致部分长片断DNA被剪切，此时可考虑酚氯仿抽提或柱纯化方法。
- 反转录产物可以直接用于后续的PCR反应等，也可以-20°C冻存以备以后使用。用于后续PCR反应时，如果PCR的反应体

系为20和50微升，则推荐相应地使用0.8和2微升反转录产物。

2. 引物延伸、探针标记等其它用途请自行参考M-MLV反转录酶(RNase H-)的相关文献资料进行。

### 常见问题：

1. 总RNA反转录产物电泳观察不到。  
反转录产物由于是从模板反转录而获得，而模板的量本身比较低，反转录的量通常还要少于模板量，并且总RNA的反转录产物大小很不均匀，因此通常总RNA的反转录产物直接电泳观察是观察不到的。
2. 反转录产物通过PCR扩增没有特异性条带。
  - a. PCR扩增没有获得特异性条带时建议先使用actin、GAPDH等作为内参进行PCR扩增，看是否可以成功扩增。如果可以成功，则说明PCR扩增体系没有问题，此时通常是目的基因的引物设计欠佳，当然也有可能是反转录产物质量欠佳。如果内参不能被很好地扩增，则有可能PCR体系存在问题或反转录产物质量欠佳。
  - b. 模板RNA发生了降解。哺乳动物细胞或组织的总RNA琼脂糖电泳后应该可以看到清晰的18S和28S rRNA条带，并且28S rRNA和18S rRNA的亮度比例应该大于等于2.0。如果比例小于2.0，则提示总RNA发生了显著的降解，最好能重新制备总RNA样品。避免RNA降解的主要方法是，严格进行RNA的相关操作，包括带洁净手套、戴一次性口罩、在洁净环境中抽提或制备RNA，以尽量避免RNase污染。
  - c. 模板RNA的纯度偏低。在提取纯化RNA的过程中，残留在溶液中的一些成分如苯酚、SDS、EDTA、胍盐、磷酸、焦磷酸、多胺、亚精胺等会抑制反转录酶活性。对RNA样品进行柱纯化，或者进行沉淀、洗涤和再溶解，通常可以有效去除残留的污染物。通常选择使用碧云天的BeyoZol或Trizol抽提获得的总RNA完全可以满足反转录反应的需要。
  - d. 反转录反应的模板量不足。在抽提获得总RNA后，在进行一些精细的定量检测时通常会进行DNase I消化，以充分去除可能的残留的DNA的干扰。DNase I进行热失活时，需要加入EDTA至终浓度为2.5mM，否则RNA在没有螯合剂的情况下，在加热过程中容易被水解，从而导致模板量不足。此外，扩增特定基因时，需要先查询该基因的组织分布特点，利用其高表达的组织进行目的基因的反转录和克隆。用该基因丰度极低的组织或细胞样品进行反转录和PCR扩增，通常会由于模板量过少而PCR扩增失败。
  - e. 没有使用适当的反转录引物。对于细菌RNA和不含poly(A)尾巴的RNA，要用random hexamer引物代替Oligo(dT)<sub>18</sub>引物。使用基因特异性反转录引物时，需要确保基因特异性引物设计合理正确。
  - f. 如果RNA模板富含GC或容易形成二级结构，此时可以考虑把反转录温度提高到45-50°C。

### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D7153	BeyoRT™ M-MLV反转录酶	2000U
D7159	BeyoRT™ M-MLV反转录酶(RNase H-)	2000U
D7160S	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	10KU
D7160M	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	50KU
D7160L	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	200KU
D7166	BeyoRT™ cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	10次
D7168S	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	20次
D7168M	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	100次
D7168L	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	500次
D7170S	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	20次
D7170M	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	100次
D7170L	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	500次
D7172	cDNA第二链合成试剂盒	10次
D7205	Taq DNA Polymerase	200U
D7207	Taq DNA Polymerase	1000U
D7216	Pfu DNA Polymerase	200U
D7217	Pfu DNA Polymerase	1000U
D7218	BeyoTaq DNA Polymerase	200U
D7219	BeyoTaq DNA Polymerase	1000U
D7226	GC-rich PCR Buffer (4种套装)	共2ml
D7228	2X PCR Master Mix	400次
D7232	PCR Kit with Taq	400次
D7233	PCR Kit with Taq	2000次
D7237	PCR Kit with BeyoTaq	400次
D7251	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	400次
D7255	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	400次

D7259	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	400次
D7371	dNTP Mixture (2.5mM each)	1ml
D7373	dNTP Mixture (25mM each)	250μl
R0011	Beyozol (总RNA抽提试剂)	100ml
R0016	Trizol (总RNA抽提试剂)	100ml
R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
R0102	RNase Inhibitor	2000U
ST036	DEPC	10g

#### 使用本产品的文献:

1. Bao W, Gu Y, Ta L, Wang K, Xu Z. Induction of autophagy by the MG 132 proteasome inhibitor is associated with endoplasmic reticulum stress in MCF 7 cells. *Mol Med Rep.* 2016 Jan;13(1):796-804.
2. Zhang CG, Yang SD, Zhu WJ, You BG, Liu Y, Yuan ZQ, Chen WL, Li JZ, Zhou XF, Liu C, Zhang XN. Distinctive polymer micelle designed for siRNA delivery and reversal of MDR1 gene-dependent multidrugresistance. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2016 Jul 13. doi: 10.1002/jbm.b.33748. [Epub ahead of print]
3. Li D, Chen J, Ye J, Zhai X, Song J, Jiang C, Wang J, Zhang H, Jia X, Zhu F. Anti-inflammatory effect of the six compounds isolated from *Nauclea officinalis* Pierrc ex Pitard, and molecular mechanism of strictosamide via suppressing the NF-κB and MAPK signaling pathway in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2017 Jan 20;196:66-74.

Version 2017.12.20