

Access RT-PCR 系统与 Access RT-PCR 入门系统

本手册是产品 A1250, A1260 和 A1280 的使用说明。请废除以往版本。

所有技术文件均可在 www.promega.com 上浏览到。
请访问该网站以确定您所使用的是该技术公告的最新版本。

I. 描述.....	1
II. 产品组分.....	2
III. 优化反转录-PCR 反应.....	3
A. RNA 模板.....	3
B. 对照反应.....	3
C. 核酸污染的避免.....	3
D. Mg ²⁺ 的浓度.....	4
E. 引物设计.....	4
F. 温度.....	4
G. 孵育时间和循环数.....	4
IV. 应用 Access RT-PCR 系统合成和分析 RT-PCR 产物.....	5
A. 操作指南.....	6
B. 分析.....	6
V. 常见问题处理.....	8
VI. 参考文献.....	9
VII. 附录.....	10
A. 缓冲液和溶液的组分.....	10
B. 对照引物序列.....	10
熟练用户的操作指南.....	11

I. 描述

目前, 已有很多技术用于检测组织和细胞内的基因表达, 这些技术包括 Northern blot、偶联的反转录和 PCR、核糖核酸酶保护分析、原位杂交、斑点杂交和 S1 核酶分析。在这些方法中, RT-PCR 的敏感性最强, 应用最为广泛。这个技术能用于确定某一基因转录物的存在与否; 在无需构建和筛选 cDNA 文库时, 估计基因表达水平, 或克隆 cDNA 产物。

普洛麦格公司的 Access RT-PCR 系统是为从总 RNA 或 mRNA 来源的特异目的 RNA 进行反转录 (RT) 和多聚酶链式反应 (PCR) 而设计的 (1)。这一单管双酶系统甚至可以对稀有 RNA 进行敏感、快速和重现性好的分析。该系统中, 用于合成第 1 条 DNA 链的 AMV 反转录酶源于禽类成髓细胞瘤病毒, 用于合成第 2 条 cDNA 链和 DNA 扩增的热稳定 Tfi DNA 聚合酶源于 *Thermus flavus* (2)。该系统是一个优化的单一缓冲液系统, 敏感性极强, 在反转录和 PCR 过程中不需要另外加入缓冲液 (图 1)。这一特点使得操作步骤简化, 减少样品污染机会。此外, 在 AMV/Tfi 5× 反应缓冲液中, 将反应温度升高到 48°C, 可减少形成 RNA 二级结构所带来的问题。

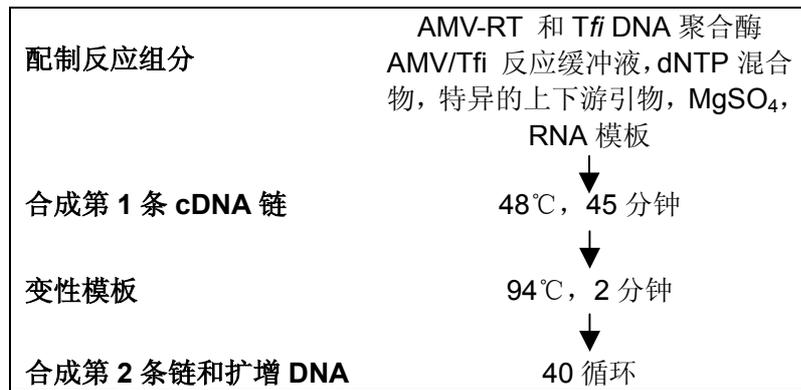


图 1. Access RT-PCR 系统操作概述

II 产品组分

产品名称	目录号
Accesss RT-PCR 系统	A1250

供实验室使用。每一系统中含有足够 100 个反应的试剂 (50μl), 包括 25

- 500u AMV 反转录酶, 5u/μl
- 500u *Tfi* DNA 多聚酶, 5u/μl
- 1ml AMV/ *Tfi* 5× 反应缓冲液
- 1.25ml MgSO₄, 25mM
- 100μl dNTP 混合物, dATP,dCTP,dGTP,dTTP 各 10mM
- 50μl 带有载体的阳性 RNA 对照 (1.25attomole/μl)
- 100μl 上游对照引物, 15μM
- 100μl 下游对照引物, 15μM
- 13ml 无核酸酶水
- 1 份 操作指南

产品名称	Cat.#
Accesss RT-PCR 系统	A1280

供实验室使用。每一系统中含有足够 500 个反应的试剂 (5 个试剂盒×100

产品名称	目录号
Accesss RT-PCR 入门系统	A1260

供实验室使用。每一系统中含有足够 20 个反应的试剂 (50μl), 包含阳性

- 100u AMV 反转录酶, 5u/μl
- 100u *Tfi* DNA 多聚酶, 5u/μl
- 1ml AMV/ *Tfi* 5× 反应缓冲液
- 1.25ml MgSO₄, 25mM
- 20μl dNTP 混合物, dATP,dCTP,dGTP,dTTP 各 10mM
- 50μl 带有载体的阳性 RNA 对照 (1.25attomole/μl)
- 100μl 上游对照引物, 15μM
- 100μl 下游对照引物, 15μM
- 13ml 无核酸酶水
- 1 份 操作指南

保存条件: 将系统中的所有组分保存于-20°C。若欲长期保存, 则将带有载体的阳性对照 RNA 存放于-70°C。参见试剂盒标签上的失效期。

III 优化反转录-PCR 反应

A. RNA 模板

反转录反应的成功有赖于作为模板的 mRNA 的完整性及纯度。参考文献 3 中介绍了创建和保持一个无 RNA 酶环境的步骤。操作时使用无菌的反应管、吸头、手套及 DEPC 处理过的水。当从核酸酶活性很高的样品中分离 RNA 时, 建议使用核酸酶抑制剂, 如 Promega 公司的 Recombinant RNasin® 核酸酶抑制剂(Cat.# N2511)。

对于从真核生物中常规纯化及快速纯化总 RNA, 我们推荐使用 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation System (Cat.# Z3100), 或者, 可以使用 RNAgents Total RNA Isolation System (Cat.#Z5110), 然后以 RQ1 RNase-Free DNase (Cat.# M6101)消化 DNA, 抽提, 再用乙醇沉淀。

对于 Poly(A)+ RNA, 可以通过使用 Poly A Tract® mRNA Isolation Systems (Cat.# Z5200, Z5253)从总 RNA 中高效地分离得到, 或者使用 Poly A Tract® System 1000 (Cat.# Z5420, Z5400)直接从真核细胞中得到。这些系统可从细胞或组织的粗裂解物中得到总 RNA 或 Poly(A)+ RNA, 且制备的 RNA 样品的纯度足以达到应用 Access RT-PCR 系统的要求。

若欲应用本系统得到较好的结果, 则 RNA 模板, 无论是总 RNA 制备物、mRNA 还是合成的 RNA 转录物, 都应是无 DNA 的。本系统中的 *Tfi* DNA 聚合酶在标准的反应条件下无反转录酶活性 (1), 但是如果 RNA 制备物中含有痕量的 DNA, 且与模板 RNA 具有相似序列时, 此反应体系就会产生该 DNA 的扩增产物。

使用 RT-PCR 扩增所需 RNA 的最小量取决于模板和引物两方面。对于提供的阳性对照 RNA 而言, 所需的 RNA 最小量为 10^3 个分子 (即 1.66×10^{-21} 摩尔) (图 2A)。应用 Access RT-PCR 系统, 每个反应中的总 RNA 模板在 10pg-1 μ g 时, 或 poly(A)+ RNA 模板在 1pg-100ng 时, 均可得到很好的扩增效果。

B. 对照反应

为了便于优化 RT-PCR 反应, 处理常见问题, 应设立阳性对照和阴性对照。阳性对照使用的是本系统提供的带有载体的阳性对照 RNA (见 VII.A) 和上、下游对照引物 (见图 2A)。阴性对照以无菌的无核酸酶水代替反应体系中 RNA 模板。

C. 核酸污染的避免

操作时应当心, 以便使样品间交叉污染的可能性减少到最低程度, 并且避免核酸 (RNA 和 DNA) 从一个反应遗留到另一个反应。扩增前后应使用不同的工作区域及加样器。使用正排式移液管或低吸附加样器尖头以减少吹吸样品时的交叉污染。操作时应戴手套并时常更换。使用 UNG (4) 或其它灭菌技术来防止 DNA 遗留到后续的反应中。

使用无菌的反应管、加样器尖头、手套及 DEPC 处理过的水来保持模板 mRNA 完整性。

注意: 上、下游对照引物只可扩增阳性对照 RNA。

扩增前后使用不同的操作区域。

具体图片, 请参
照原图

使用前将 Mg^{2+}
储存液充分摇
匀是关键。

不要在 $94^{\circ}C$ 孵
育 AMV 反转录
酶, 否则该酶会
失活。

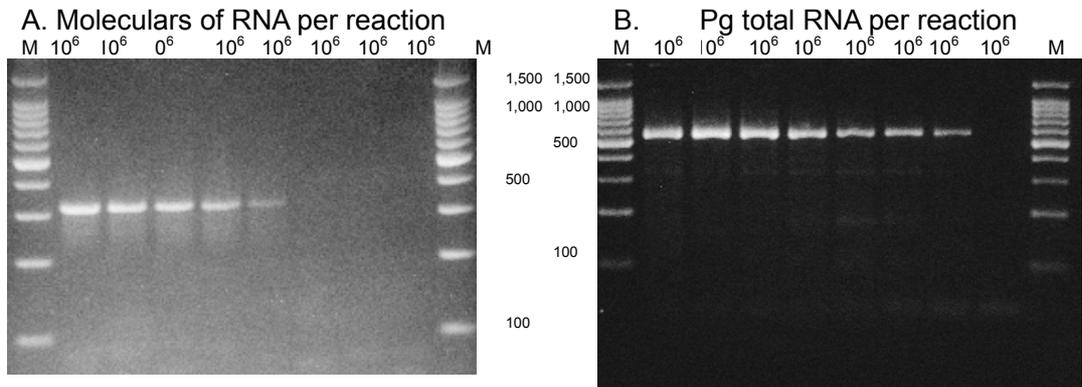


图 2. 应用 Access RT-PCR 系统进行的特异 RNA 扩增。 **A.** 以无核酸酶水对本系统提供的阳性对照 RNA 进行 10 倍系列稀释。使用系统中提供的对照寡核苷酸引物, 依照第 IV 部分所述进行 RT-PCR 反应, 每一反应中所含的阳性对照 RNA 如图所示。将每一扩增反应的等量部分进行 3% NuSieve®/1% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳缓冲液为 $1 \times TAE$, 含 $0.5 \mu g/ml$ 溴化乙锭。323bp 特异扩增产物如图所示。M 泳道为 Promega 公司的 100bp DNA 分子量梯度标记物 (目录号: #G2101)。 **B.** 使用小鼠 β -actin 的特异寡核苷酸引物, 依照第 IV 部分进行 RT-PCR 反应, 反应中包含的小鼠肝脏总 RNA 量如图所示。将每一扩增反应的等量部分进行 3% NuSieve®/1% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳缓冲液为 $1 \times TAE$, 含 $0.5 \mu g/ml$ 溴化乙锭。M 泳道为普洛麦格公司的 100bp DNA 分子量梯度标记物 (目录号: #G2101)。

D. 镁离子浓度

Access RT-PCR 系统中 AMV 反转录酶与 Tfi DNA 聚合酶所要求的 Mg^{2+} 浓度受反应体系中核苷酸、寡核苷酸引物及模板终浓度的影响。每一实验均需依据目的 mRNA/引物的不同组合来确定 $MgSO_4$ 的最佳浓度。尽管 $1.0-2.5mM$ 的 $MgSO_4$ 适用于大多数扩增反应, 但是以滴定的方法确定 $MgSO_4$ 的浓度能够显著地改进敏感性、特异性及反转录和扩增产物的质量。

为确定某一特定模板/引物组合所需的最佳 Mg^{2+} 浓度, 需准备一个 $MgSO_4$ 浓度递增体系, 含 $1.0-3.0 mM MgSO_4$, 递增浓度间隔为 $0.5mM$, 该体系可以通过将 2, 3, 4, 5, $6 \mu l$ 的 $25mM$ 的 $MgSO_4$ 储存液分别加入到 $50 \mu l$ 的反应体系中获得。

E. 引物设计

第 1 条链的合成需要使用特异引物。特异性引物仅与指定的 mRNA 序列退火, 并且可用于从特定的 mRNA, 而不是样品中的全部 mRNA, 合成 cDNA。为了区分 cDNA 的扩增与污染的基因组 DNA 扩增, 引物可以设计为与两端内含子以外的外显子序列互补。这样, 基因组 DNA 的扩增产物就比 RT-PCR 反应产物的长得多。这一长度上的差别不仅可以用凝胶电泳将两种产物区分开, 而且有利于较小的 cDNA 来源的产物进行合成 (PCR 倾向于扩增短片段)。不论选用何种引物, 反应中的引物终浓度需进行优化。我们推荐以引物浓度为 $50pmol$ (反应中的终浓度为 $1 \mu M$) 为优化的起始浓度。

F. 温度

Access RT-PCR 系统在启动反转录反应前不需要模板变性步骤。如果需要, 则可包含一个变性步骤, 即在另一个反应管中加入引物和 RNA 模板, $94^{\circ}C$ 孵育 2 分钟。然后将模板/引物混合物加入到 RT-PCR 反应混合物中, $48^{\circ}C$ 温育进行标准的反转录反应。

当温度在 $37-48^{\circ}C$ 时, AMV 反转录酶在 AMV/Tfi $5 \times$ 反应缓冲液中是有活性的。我们推荐反转录反应在 $48^{\circ}C$ 进行, 以便使 RNA 二级结构的形成减少到最低程度, 且这样做有利于全长 cDNA 的合成。在反转录反应之后, 我们建议将反应体系于 $94^{\circ}C$ 孵育 2 分钟, 以使杂交的 RNA/cDNA 变性, 同时灭活 AMV 反转录酶。据报道, AMV 反转录酶必须被灭活, 从而在使用耐热 DNA 聚合酶如 Tfi DNA 聚合酶时能够得到高产量的扩增产物 (5,6)。

在决定 PCR 扩增循环的温度时，引物的序列是一个应主要考虑的因素。一个扩增循环一般包括三步：变性（94℃）、模板/引物退火（42-60℃）及延伸（68℃）。对于具有高解链温度（T_m）的引物而言，将退火和延伸温度升高是有利的。因为较高的温度可使模板与引物的非特异性结合减少到最低程度，从而提高特异性产物的产量。而对于低 T_m 值的引物而言，则有必要降低退火温度，从而使引物结合到目的模板上。

G. 孵育时间及循环数

当孵育温度为 37-48℃ 时，有效的第 1 条 cDNA 链的合成可在 20-60 分钟内完成。一般情况下，我们建议实验开始时先选用 48℃，45 分钟。

在第 1 条 cDNA 链合成之后，将反应体系于 94℃ 孵育 2 分钟，使 AMV 反转录酶失活，同时使杂交的 RNA/cDNA 变性。这一步骤直接导致第 2 条 cDNA 链的合成，进入 PCR 扩增阶段。大多数 RNA 样品经 40 个扩增循环后均可被检测到。如果目的 RNA 含量稀少或可供实验用样品材料量少，则有必要将循环数提高到 45 或 50。在延伸过程中，每 1kb 长度的扩增引物大约需要 1 分钟的时间进行延伸（最小延伸时间=1 分钟）。最后的 68℃、7 分钟的延伸步骤将截短的扩增产物延长为全长扩增产物，从而可提高终产品的质量。

IV. 应用 Access RT-PCR 系统合成和分析 RT-PCR 产物

图 3 所示的反转录和 PCR 循环轮廓可作为初始实验的指导原则。这些条件适用于检测应用 Access RT-PCR 系统提供的阳性对照 RNA 及上、下游对照引物制备的长度为 323bp 的 PCR 产物。我们建议在每一个独立的实验中，针对引物和目的 RNA 的组合情况，对第 III 部分讨论的诸反应参数进行优化。

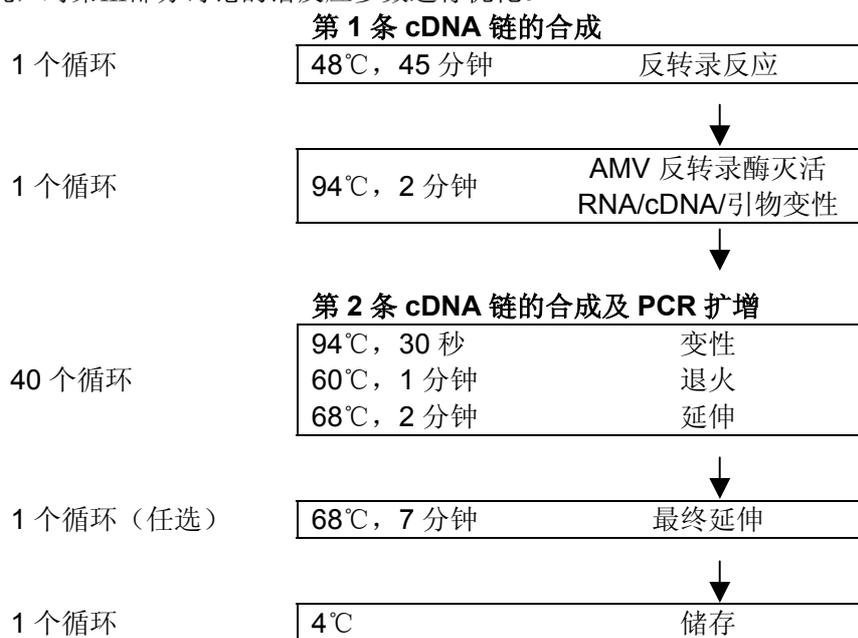


图 3. 反转录及 PCR 循环轮廓

注意：熟练用户的操作指南可在本技术公告结尾部分找到。

A. 操作指南

用户需准备的实验材料：

- 下游寡核苷酸引物
- 上游寡核苷酸引物
- 无核酸酶的矿物油（如 Sigma Cat.#M5904）

1. 按照指定的体积将无核酸酶水，AMV/*Tfi* 5x 反应缓冲液，dNTP 混合物，特异上下游引物及 25mM MgSO₄ 加入到置于冰上的 0.5ml 薄壁反应管中，配制反应混合物。反复吹吸使混合物中各组分混合均匀。然后向反应体系中加入 AMV 反转录酶和 *Tfi* DNA 聚合酶。将反应管轻柔震荡 10 秒以使该混合物混匀。如需要做多个样品的 RT-PCR 反应，则应在冰上先配制一总的混合物，该混合物由反应体系中各组分按其指定体积的适当倍数组成，然后取该总混合物 48μl 加入到每一反应管中。向各反应管中加入模板以启动反应。每次加样均应使用单独的加样器枪头，小心勿使样品之间相互污染。

2.

	体积	终浓度
无核酸酶水（加至终体积为 50μl）	Xμl	
AMV/ <i>Tfi</i> 5x 反应缓冲液（见注释 1）	10μl	1x
dNTP 混合物（每 dNTP 10mM）（见注释 2）	1μl	0.2mM
下游引物*	50pmol	1μM
上游引物*	50pmol	1μM
25mM MgSO ₄ （见注释 2）	2μl	1mM
AMV 反转录酶（5U/μl）	1μl	0.1U/μl
<i>Tfi</i> DNA 聚合酶（5U/μl）	1μl	0.1U/μl
RNA 样品或对照（见第 III 部分 A）**	Yμl	
终体积	50μl	

* 计算引物为 50pmol 时所对应的质量（纳克）的通用公式为：
50pmol=16.3ng×b；b 为引物碱基数目。对于阳性对照反应，上、下游对照引物均使用 3.3μl（50pmol）。

**10³-10⁶ 拷贝的特异目的模板或 1pg-1μg 的总 RNA。使用 2μl 带有载体的阳性对照 RNA（2.5 attomole 或 1×10⁶ 个拷贝）。

2. 加入 1 或 2 滴（20-40μl）无核酸酶的矿物油覆盖反应体系，以防止反应物浓缩和蒸发。

3. 将各反应管置于可控温的加热器中，48℃ 孵育 45 分钟。

将各反应管直接进入热循环反应，使反应体系进行第 2 条 cDNA 链的合成及扩增（参见前述的热循环轮廓）。

B. 分析

1. 取总反应体系的 5% 进行琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。紫外透射下可见溴化乙锭染色凝胶中的 PCR 产物。应用阳性对照 RNA 和上、下游对照引物得到的扩增产物的长度为 323bp (图 4)。

注：偶尔可见一大约 220bp 的扩增产物伴随阳性对照 RNA 产物出现。这一产物源于加入阳性对照 RNA 中的 *E.coli* 载体 RNA 序列。

2. 使用前将反应产物储存于 -20℃。反应产物可用 Wizard® PCR Preps DNA 纯化系统 (目录号.#A7170;7) 进行纯化。

1	GAATACAAGC	TTGGGCGTGT	CTCAAATCT	CTGATGTTAC	ATTGCACAAG
51	ATAAAAATAT	ATCATCATGA	ACAATAAAC	TGTCTGCTTA	CATAAACAGT
101	AATACAAGGG	GTGTTATGAG	CCATATTCAA	CGGGAAACGT	CTTGCTCGAG
151	GCCGCGATTA	AATTCCAACA	TGGATGCTGA	TTTATATGGG	TATAAATGGG
201	CTCGCGATAA	TGTCGGGCAA	TCAGGTGCGA	CAATCTATCG	ATTGTATGGG
251	AAGCCCGATG	CGCCAGAGTT	GTTTCTGAAA	CATGGCAAAG	GTAGCGTTGC
301	CAATGATGTT	ACAGATGAGA	TGGTCAGACT	AAACTGGCTG	ACGGAATTTA
351	TGCCTCTTCC	GACCATCAAG	CATTTTATCC	GTACTCCTGA	TGATGCATGG
401	TTACTCACCA	CTGCGATCCC	CGGGAAAACA	GCATTCCAGG	TATTAGAAGA
451	ATATCCTGAG	TCAGGTGAAA	ATATTGTTGA	TGCGCTGGCA	GTGTTCCCTGC
501	GCCGTTGCA	TTCGATTCCT	GTTTGTAATT	GTCCTTTTAA	CAGCGATCGC
551	GTATTTGTC	TCGCTCAGGC	GCAATCACGA	ATGAATAACG	GTTTGGTTGA
601	TGCGAGTGAT	TTTGATGACG	AGCGTAATGG	CTGGCCTGTT	GAACAAGTCT
651	GGAAAGAAAT	GCATAAGCTT	TTGCCATTCT	CACCGGATTC	AGTCGTCACT
	Upstream Control Primer		5' -GCCATTCT	CACCGGATTC	AGTCGTC - 3'
701	CATGGTGATT	TCTCACTTGA	TAACCTTATT	TTTGACGAGG	GGAAATTAAT
751	AGGTTGTATT	GATGTTGGAC	GAGTCGGAAT	CGCAGACCGA	TACCAGGATC
801	TTGCCATCCT	ATGGAAGTGC	CTCGGTGAGT	TTTCTCCTTC	ATTACAGAAA
851	CGGCTTTTTTC	AAAAATATGG	TATTGATAAT	CCTGATATGA	ATAAATTGCA
901	GTTTCATTG	ATGCTCGATG	AGTTTTTCTA	ATCAGAATTG	GTTAATTGGT
951	TGTAACACTG	GCAGAGCATT	ACGCTGACTT	GACGGGACGG	CGGCTTTGTT
	Downstream Control Primer		3' -GACTGAA	CTGCCCTGCC	GCCGA - 5'
1001	GAATAAATCG	AACTTTTGCT	GAGTTGAAGG	ATCAGATCAC	GCATCTTCCC
1051	GACAACGCAG	ACCGTTCGGT	GGCAAAGCAA	AAGTTCAAAA	TCACCAACTG
1101	GTCCACCTAC	AACAAAGCTC	TCATCAACCG	TGGCGACTCT	AGAGGATCCC
1151	CGGGCGAGCT	CCCAAAAAA	AAAAAATAAA	AAAAAATAAA	AAACCGAATT

图4. 阳性对照RNA、上游对照引物及下游对照引物的序列。预期的cDNA产物长度为323bp。

如有未涉及到的问题，请与贵处 Promega 办事处或经销商联系。请登录 www.promega.com 获取有关信息。

E-mail:
techserv@promega.com

V 常见问题处理

问题	可能的原因	建议
第 1 条 cDNA 链产物产量低或没得到	RNA 被降解	通过变性琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的完整性。 确保试剂、加样器尖头及反应管均无 RNA 酶。在有核酸酶抑制剂（如 Promega 公司的 rRNasin® 核酸酶抑制剂）存在的情况下分离 RNA。
	AMV 反转录酶被高温灭活	如果在实验方案的开始加入了一个变性/退火步骤，则应确保在变性步骤及此后的 48°C 恒温之后再加入含有 AMV 反转录酶的酶混合物。
	引物的特异性	核对“下游”引物是否与 RNA 下游序列相互补。
	引物退火	如果以寡聚（dT）作为“下游”引物，则应确认在反转录反应之前，于适当的温度，如 37°C，进行退火反应。
	RNA 纯化问题	一些 RNA 纯化过程中遗留的试剂（如 SDS、NaCl、肝素、异硫氰酸胍）会干扰 RT-PCR。减少目的 RNA 的体积，将反应物进行再纯化，或者改变纯化方法。
扩增产物的分子量高于预期值	于模板 RNA 相关的基因组 DNA 污染了 RNA 制备物	使用 RQ1 无 RNA 酶的 DNA 酶消化污染的 DNA。
扩增产物产量低或没有扩增产物	循环数不够	将反应体系再进行 5 个循环
	热循环仪程序出现错误	检查设置的时间和温度是否正确
	热循环仪中的一些部位温度太低	设定一组阳性对照，用以确认在热循环仪的某些特定部位 PCR 产物的产量是否太低。
	反应条件不合适	降低退火温度和/或针对较长的扩增产物而延长延伸时间。
	遗漏反应体系中的组分	查对反应体系中的组分并重新进行反应
	矿物油的问题	反应体系必须用高质量的、无核酸酶活性的轻质矿物油覆盖。 不要 使用经高压灭菌处理过的矿物油。
	反应管未经高压灭菌处理	将反应管进行高压灭菌，去除抑制扩增的污染物。
第 1 条链产量不足	参见上述“第 1 条链产量低或没有得到”之讨论。	
引物设计不当	确认引物无自身互补或两条引物不互补。检查 PCR 引物的长度及 T _m 。	

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 TB220。如遇到问题请与 Promega 公司北京办事处联系，TEL: 010-68498287; E-mail: techserv@promega.com.cn 技术手册号码：CTB220

现象	可能原因	评论
扩增产物产量低 或没有扩增产物	引物的特异性 错误	检查所设计的引物是否与正确的链互补。
	反应条件不是 最佳	优化 $MgSO_4$ 浓度、退火温度及延伸时间。确认两条引物浓度相同。使用 $MgSO_4$ 前将其震荡混匀。
	核苷酸降解	将核苷酸小量分装，冻存。快速融化，融化后置于冰上。避免反复冻融。
多个，非特异性 扩增产物	目的序列不在 目的 RNA 上	重新设计实验，或尝试用其它来源的目的 RNA。
	反应条件不是 最佳	优化 $MgSO_4$ 浓度及退火温度。使用 $MgSO_4$ 前将其震荡混匀。
	引物设计不当	确认引物无自身互补，或两条引物不互补，尤其在近 3'端。检查 PCR 引物的长度和 T_m 。避免在引物的 3'端使用 3 个连续的 G 或 C。
	体系被另一目的 RNA/DNA 污染	加样时使用正排式移液管、气阻枪头以减少交叉污染。在扩增前和扩增后分别应用独立的操作区域和加样器。戴手套并经常更换。采用 UNG (4) 或另一种灭菌方法来防止 DNA 遗留到后续反应中。
	目的 RNA 中含 有多个目的序 列	设计新引物。

VI. 参考文献:

1. Miller, K. and Storts, D. (1995) PCR Access! A sensitive single-tube two-enzyme system for RTPCR. *Promega Notes***53**, 2–5.
2. Kaledin, A.S., Slyusarenko, A.G. and Gorodetskii, S.I. (1981) Isolation and properties of DNA polymerase from the extreme thermophilic bacterium *Thermus ruber*. *Biokhimiia***46**, 1576–84.
3. Blumberg, D.D. (1987) Creating a ribonuclease-free environment. *Meth. Enzymol.* **152**, 20–4.
4. Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. (1990) Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene***93**, 125–8.
5. Sellner, L.N., Coelen, R.J. and Mackenzie, J.S. (1992) Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucl. Acids Res.* **20**, 1487–90.
6. Chumakov, K.M. (1994) Reverse transcriptase can inhibit PCR and stimulate primer-dimer formation. *PCR Meth. Appl.* **4**, 62–4.
7. Wizard® PCR Preps DNA Purification System Technical Bulletin#TB118, Promega Corporation.

VII. 附录

A. 缓冲液及溶液的组成

dNTP 混合物, 10mM	TAE 50×缓冲液
dNTP, dNTP, dNTP 各 10mM, 溶解于水中。	242g Tris 碱 57.1ml 冰乙酸 100ml 0.5M EDTA (pH8.0) 加去离子水至 1 升
带有载体的阳性对照 RNA	Tfi DNA 聚合酶储存缓冲液
1.25amol/μl 1.2kb 抗卡那霉素 基因 Mrna (通过体外转录制备) 3μg/ml E. coli rRNA (载体) 10mM Tris-HCL (pH8.0) 0.1mM EDTA	50% 甘油 20mM Tris-HCL (pH8.0) 100mM KCL 0.1mM EDTA 1mM DTT 0.5% Nonidet®-P40 0.5% Tween®-20
MgSO4 溶液	
25mm MgSO4 溶于水中	

B. 对照引物序列

上游对照引物: 5' GCC ATT CTC ACC GGA TTC AGT CGT C 3'

下游对照引物: 5' AGC CGC CGT CCC GTC AAG TCA G 3'

Access RT-PCR 系统：经验用户的实验方案

这一概述性的实验方案旨在为使用过本系统的经验用户提供一个提示。当您第 1 次使用 Access RT-PCR 系统时，请参照第 III 和第 IV 部分介绍的完整方案进行实验。

<p>配制反应混合物 (IV.A)</p>	<p>1. 在冰上将无核酸酶的水、AMV/ <i>Tfi</i> 5× 反应缓冲液、dNTP 混合物、特异性的上下游引物及 25mM MgSO₄ 按照指定的体积加入到 0.5ml 薄壁反应管中。反复吹吸混匀。然后向反应体系中加入 AMV 反转录酶和 <i>Tfi</i> DNA 聚合酶。轻柔震荡混匀。</p> <table border="1" data-bbox="339 465 1152 907"> <thead> <tr> <th></th> <th>体积</th> <th>终浓度</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>无核酸酶水(加至终体积为 50μl)</td> <td>Xμl</td> <td></td> </tr> <tr> <td>AMV/ <i>Tfi</i> 5× 反应缓冲液</td> <td>10μl</td> <td>1×</td> </tr> <tr> <td>dNTP 混合物 (每 dNTP 10mM)</td> <td>1μl</td> <td>0.2mM</td> </tr> <tr> <td>下游引物</td> <td>50pmol</td> <td>1μM</td> </tr> <tr> <td>上游引物</td> <td>50pmol</td> <td>1μM</td> </tr> <tr> <td>25mM MgSO₄</td> <td>2μl</td> <td>1mM</td> </tr> <tr> <td>AMV 反转录酶 (5U/μl)</td> <td>1μl</td> <td>0.1U/μl</td> </tr> <tr> <td><i>Tfi</i> DNA 聚合酶 (5U/μl)</td> <td>1μl</td> <td>0.1U/μl</td> </tr> <tr> <td>RNA 样品或对照 (见 III.A)</td> <td>Yμl</td> <td></td> </tr> <tr> <td>终体积</td> <td>50μl</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>2. 加入模板启动反应。 3. 在反应物上覆盖 1 或 2 滴矿物油。 4. 下述条件适用于检测应用 Access RT-PCR 系统提供的阳性对照 RNA 及上、下游对照引物制备的长度为 323bp 的 PCR 产物。建议在每一个独立的实验中，应针对引物和目的 RNA 的结合情况对反应条件进行优化。</p>			体积	终浓度	无核酸酶水(加至终体积为 50μl)	Xμl		AMV/ <i>Tfi</i> 5× 反应缓冲液	10μl	1×	dNTP 混合物 (每 dNTP 10mM)	1μl	0.2mM	下游引物	50pmol	1μM	上游引物	50pmol	1μM	25mM MgSO ₄	2μl	1mM	AMV 反转录酶 (5U/μl)	1μl	0.1U/μl	<i>Tfi</i> DNA 聚合酶 (5U/μl)	1μl	0.1U/μl	RNA 样品或对照 (见 III.A)	Yμl		终体积	50μl	
	体积	终浓度																																	
无核酸酶水(加至终体积为 50μl)	Xμl																																		
AMV/ <i>Tfi</i> 5× 反应缓冲液	10μl	1×																																	
dNTP 混合物 (每 dNTP 10mM)	1μl	0.2mM																																	
下游引物	50pmol	1μM																																	
上游引物	50pmol	1μM																																	
25mM MgSO ₄	2μl	1mM																																	
AMV 反转录酶 (5U/μl)	1μl	0.1U/μl																																	
<i>Tfi</i> DNA 聚合酶 (5U/μl)	1μl	0.1U/μl																																	
RNA 样品或对照 (见 III.A)	Yμl																																		
终体积	50μl																																		
<p>合成第 1 条 cDNA 链 (IV.A)</p>	<p>1 个循环</p>	<table border="1" data-bbox="598 1153 1152 1220"> <tr> <td>48°C, 45 分钟</td> <td>反转录</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">↓</p> <table border="1" data-bbox="598 1243 1152 1355"> <tr> <td>94°C, 2 分钟</td> <td>AMV 反转录酶灭活 RNA/cDNA/ 引物变</td> </tr> </table>	48°C, 45 分钟	反转录	94°C, 2 分钟	AMV 反转录酶灭活 RNA/cDNA/ 引物变																													
48°C, 45 分钟	反转录																																		
94°C, 2 分钟	AMV 反转录酶灭活 RNA/cDNA/ 引物变																																		
<p>合成第 2 条 cDNA 链及 PCR 扩增 (IV.A)</p>	<p>40 个循环</p> <p>1 个循环 (可选择)</p> <p>1 个循环</p>	<table border="1" data-bbox="598 1355 1152 1489"> <tr> <td>94°C, 30 秒</td> <td>变性</td> </tr> <tr> <td>60°C, 1 分钟</td> <td>退火</td> </tr> <tr> <td>68°C, 2 分钟</td> <td>延伸</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">↓</p> <table border="1" data-bbox="598 1523 1152 1579"> <tr> <td>68°C, 7 分钟</td> <td>最终延伸</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">↓</p> <table border="1" data-bbox="598 1612 1152 1668"> <tr> <td>4°C</td> <td>储存</td> </tr> </table>	94°C, 30 秒	变性	60°C, 1 分钟	退火	68°C, 2 分钟	延伸	68°C, 7 分钟	最终延伸	4°C	储存																							
94°C, 30 秒	变性																																		
60°C, 1 分钟	退火																																		
68°C, 2 分钟	延伸																																		
68°C, 7 分钟	最终延伸																																		
4°C	储存																																		
<p>分析 (IV.B)</p>	<p>5. 取总反应体系的 5% 进行琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。 6. 使用前将反应产物储存于 -20°C。</p>																																		