Code No. R026A

研究用

TaKaRa

# PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit

说明书

v202110Da

# 目　　录


| 内　容 | 页 码 |
| --- | --- |
| ● 制品说明 | 1 |
| ● 制品内容 | 1 |
| ● 保　　存 | 2 |
| ● 试剂盒原理 | 2 |
| ● 试剂盒特点 | 3 |
| ● 使用注意 | 3 |
| ● 实验操作 | 3 |
| ● 实验例 | 4 |
| ● RNA 样品的制备 | 6 |
| ● PCR 扩增产物的电泳、克隆和限制酶酶切相关说明 | 6 |
| ● 关联产品 | 7 |

## ● 制品说明

PCR（Polymerase Chain Reaction；聚合酶链式反应）是一种使用两种引物扩增目的DNA的方法。虽然原理上PCR法是扩增DNA，RNA不能直接被扩增，但是经过反转录酶的作用将RNA反转录成cDNA后扩增（RT-PCR），PCR法便可应用于RNA的解析了。目前，此方法已广泛应用于RNA的构造解析、cDNA的克隆及RNA水平上的表达解析等多种领域。

PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit是在一个反应管中连续进行反应的1 step RT-PCR用试剂盒。反转录酶使用延伸性能好且能够合成全长cDNA的PrimeScript II RTase，PCR使用准确性高且适于扩增长链及GC Rich cDNA的PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase，这两种酶经优化后可用于1 step RT-PCR。

本试剂盒可用于宽泛浓度RNA起始的反应，在反转录反应10分钟、PCR反应延伸时间为10秒/kb的高速条件下，能够扩增难扩增的长链及GC rich等各种目的基因，可简便快速且准确地获得cDNA产物。

本试剂盒具有以下优点：

- 使用单管反应，降低污染的风险，可准确且简便地扩增RNA起始的目的基因。
- 反转录反应只需10分钟，PCR延伸时间达10秒/kb的高速反应。
- 可扩增GC rich、长链cDNA。
- 反应中total RNA的使用量范围广，易于使用。

本试剂盒含有RNA起始合成cDNA及经PCR扩增cDNA所需的全部试剂。

## ● 制品内容（50 次量）

| | | |
|---|---|---|
| 1. PrimeScript II RT Enzyme Mix | 50 | μl |
| 2. PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR | 200 | μl |
| 3. 2 × One Step High Fidelity Buffer | 625 | μl×2 |
| 4. Control F-1 Primer*1（20 μM） | 10 | μl |
| 5. Control R-1 Primer*2（20 μM） | 10 | μl |
| 6. Positive Control RNA（$2\times10^5$ copies/μl） | 20 | μl |
| 7. RNase Free $dH_2O$ | 625 | μl×2 |

*1 Positive Control RNA 用上游引物。

*2 Positive Control RNA 用下游引物。

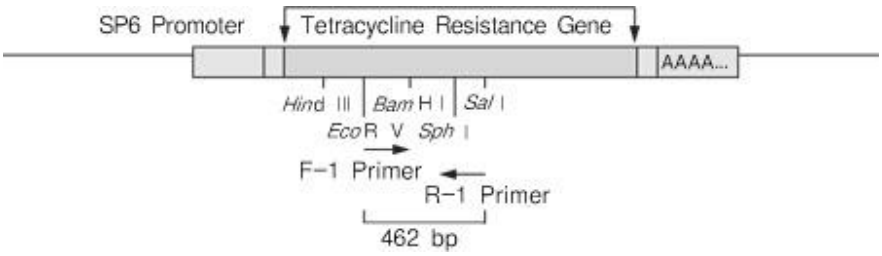



图 1. Control RNA: 使用 Control Primer 时扩增的 DNA 片段

【各种引物序列】

| 引物名称 | 各引物序列 |
|---|---|
| Control F-1 Primer | 5’-CTGCTCGCTTCGCTACTTGGA-3’ |
| Control R-1 Primer | 5’-CGGCACCTGTCCTACGAGTTG-3’ |

【Positive Control RNA】

本试剂盒中的 Control RNA 是以 pSPTet3 质粒（质粒中的 SP6 启动子下游插入长约 1.4 kb 的 pBR322 来源的 DNA 片段，DNA 片段上含有抗四环素基因）为模板由 SP6 RNA 聚合酶经体外转录而得到的。

**【试剂盒以外必需试剂及仪器】**

1. 基因扩增系统（authorized instruments）
   TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient（Code No. TP600）
   TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch*（Code No. TP350）等
2. Agarose Gel
   Agarose L03「TAKARA」(Code No. 5003/5003B)
   PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve（Code No. 5810A）等
3. 电泳装置
   Mupid-2plus（Code No. M-2P）
   Mupid-exU（Code No. EXU-1）等
4. 微型离心机
5. micropipette 及 tip（经高压灭菌处理完的）

## ● 保 存: −20℃

## ● 试剂盒原理

使用 PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit，首先通过 PrimeScript II RTase 从 RNA 起始合成 cDNA、接着在相同的反应体系中经 PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR 进行扩增。

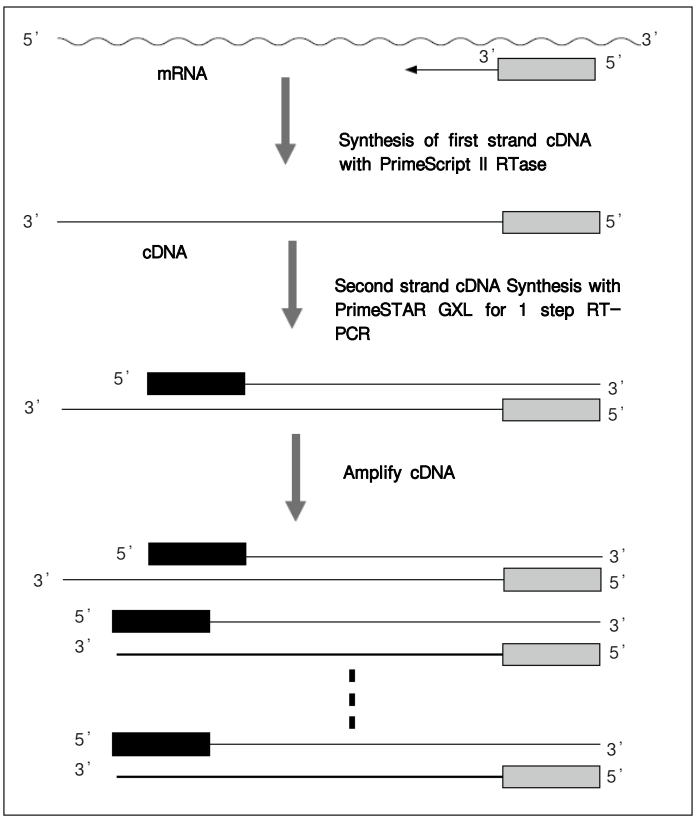



图 2. PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit 的原理

## ● 试剂盒特点

| | |
|---|---|
| RNA 模板 | 适用于所有 RNA |
| 扩增片段大小 | ～8 kb |
| 反转录酶 | PrimeScript II RTase（使用温度 45℃） |
| DNA Polymerase | PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR |
| RNase Inhibitor | 必须使用（ PrimeScript II RT Enzyme Mix 中含有） |
| 1st Strand cDNA 合成用引物 | 使用特异性下游引物（PCR 扩增反应用反义链引物）<br>（不可使用 Random 6 mers 及 Oligo dT Primer） |
| 操作 | 在一个反应管中连续的进行 RT-PCR 反应 |

## ● 使用注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前一定认真阅读。

1） 当同时需要进行多个 RT-PCR 反应时，应先配制各种试剂的混合液（Master Mix；其中包括 RNase Free $dH_2O$、Buffer、dNTP Mixture 等），然后再分装到每个反应管中。这样，可使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失，避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作或实验之间产生的误差。

2） 使用 PrimeScript II RT Enzyme Mix、PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR 等酶类产品时，应轻轻混匀，避免起泡；分取之前要小心地离心收集到反应管底部；由于酶保存液中含有 50%的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。

3） 2 × One Step High Fidelity Buffer 使用前需充分 vortex 后，离心备用。

4） 酶制品应在实验前才从-20℃中取出，使用后也应立即放入-20℃保存。

5） 为了防止 Positive Control RNA 分解，应尽量避免反复冻融，建议将其分成小包装后冻存。有条件的实验室最好保存于-70℃～-80℃。

6） 分装试剂时务必使用新的枪头（Tip），以防止样品间污染。

7） 本试剂盒的反转录反应使用基因特异性引物。不要使用 Random Primer 或 Oligo-dT Primer。

## ● 实验操作

1. 按下列组分配制反应液。

| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
|---|---|---|
| 2 × One Step High Fidelity Buffer | 25 μl | 1× |
| PrimeScript II RT Enzyme Mix | 1 μl | |
| PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR | 4 μl | |
| 上游 Primer (20 μM)*1 | 1 μl | 0.4 μM |
| 下游 Primer (20 μM)*2 | 1 μl | 0.4 μM |
| Template RNA | *3 | |
| RNase Free $dH_2O$ | up to 50 μl | |

*1 Positive Control RNA 使用 F-1 Primer。

*2 Positive Control RNA 使用 R-1 Primer。

*3 推荐 Total RNA 的使用量范围在 10-1,000 ng 之间。Positive Control RNA 为模板时使用量为 1 μl。

2. 反应条件

【一般实验的 PCR 反应条件】

| | | |
|---|---|---|
| 45℃ *4 | 10 min | |
| 94℃ | 2 min | |
| ↓ | | |
| 98℃ | 10 sec | 30 Cycles |
| 60 或 55℃*5 | 15 sec | |
| 68℃ | 10 sec/kb*6 | |

【Positive Control RNA 的 PCR 反应条件】 Control 反应可确认到 462 bp 的扩增片段。

| | | |
|---|---|---|
| 45℃ | 10 min | |
| 94℃ | 2 min | |
| ↓ | | |
| 98℃ | 10 sec | 30 Cycles |
| 60℃ | 15 sec | |
| 68℃ | 10 sec | |

*4 反转录反应温度

使用 PrimeScript II RTase(PrimeScript II RT Enzyme Mix 中含有)可以提高反应特异性，使用特异性下游引物进行反转录反应时，可在 45℃进行反转录反应，不会引起 RNA 的降解及酶的失活。

扩增超过 6 kb 的长链 DNA 时，通过将反转录反应时间延长至 15 分钟，可以提高 cDNA 的合成量。

*5 退火温度

引物的 Tm 值（按下述公式计算）在 55℃以上时，设定为 60℃；引物的 Tm 值在 55℃以下时，设定为 55℃。

※ Tm 值计算方法

Tm 值（℃）＝ [(A、T 数)x 2]+[(G、C 数)x 4]−5

*6 延伸时间设定为1 kb 使用10 sec。不足1 kb 时请设为10 sec。

上述反应条件下扩增效率不良时，请进行如下研讨：

＜扩增产物出现Smear及非特异性扩增时＞

（1） 将退火温度每次间隔2℃上升至63℃。

（2） 引物的Tm值在50℃以下时，退火温度尝试在50～55℃之间选择。

＜无扩增产物或扩增产物少时＞

（1） 模板使用量根据推荐量来添加。

（2） 增加PCR循环圈数至40～50 Cycles。

（3） 尝试每次间隔2℃下降退火温度。

※ 使用本试剂盒进行PCR反应时不能用dUTP替代dTTP（反应效果明显下降）。此外，请尽量避免使用含有次黄嘌呤的引物。

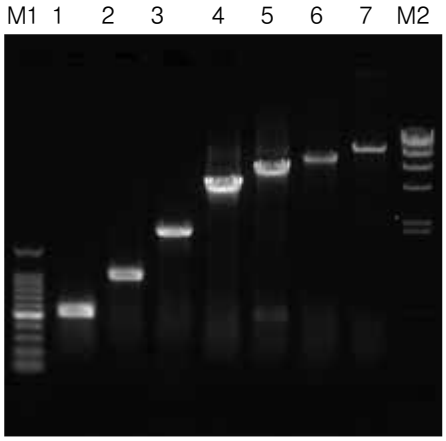
## ● 实验例

1. 确认扩增片段的长度

【方法】以人心脏和小鼠心脏来源的 total RNA 及 HL60 细胞来源的 total RNA 为模板（1 μg/50 μl 反应体系），使用 1 Step RT−PCR 对不同长度的目的片段进行扩增。

反应条件如下：

| | | |
|---|---|---|
| 45℃ | 10 min（注意 12 kb 时使用 15 min） | |
| 94℃ | 2 min | |
| ↓ | | |
| 98℃ | 10 sec | 30 cycles |
| 55℃ | 15 sec | |
| | (注 8、12 kb 时用 60℃) | |
| 68℃ | 10 sec/kb | |




| Target | Size（Template） |
|---|---|
| 1: TFR | 0.5 kb（HL60 来源 total RNA） |
| 2: Dystrophin | 1 kb（人心脏来源 total RNA） |
| 3: Dystrophin | 2 kb（人心脏来源 total RNA） |
| 4: TFR | 4.4 kb（HL60 来源 total RNA） |
| 5: Dystrophin | 6 kb（小鼠心脏来源 total RNA） |
| 6: Dystrophin | 8 kb（小鼠心脏来源 total RNA） |
| 7: Dystrophin | 12 kb（小鼠心脏来源 total RNA） |

M1: 100 bp DNA Ladder

M2: λ−*Hin*d III digest

【结果】已确认可扩增 0.5–12 kb。

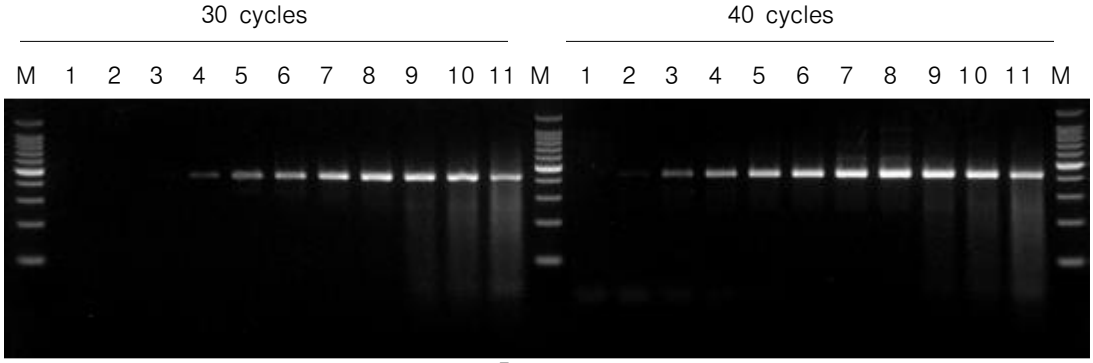
2. 灵敏度检测

【方法】

以不同量的 HL60 total RNA 为模板，以 428 bp 的 GAPDH 基因为目的基因，进行 1 Step RT-PCR 反应检测灵敏度。

反应条件如下：

| | | |
|---|---|---|
| 45℃ | 10 min | |
| 94℃ | 2 min | |
| ↓ | | |
| 98℃ | 10 sec | 30 or 40 Cycles |
| 55℃ | 15 sec | |
| 68℃ | 10 sec | |



Template 量（HL60 total RNA）

| | |
|---|---|
| 1 ： 10 fg | 7 ： 10 ng |
| 2 ： 100 fg | 8 ： 100 ng |
| 3 ： 1 pg | 9 ： 1 μg |
| 4 ： 10 pg | 10 ： 2 μg |
| 5 ： 100 pg | 11 ： 4 μg |
| 6 ： 1 ng | M ： 100 bp DNA Ladder |

【结果】

Total RNA 使用量为 10 pg (30 cycles)或 100 fg (40 cycles)时可以检出；此外，当 Total RNA 使用量为 4 μg 时也可以得到良好的结果，表明反应使用模板量的允许范围广。

## ● RNA 样品的制备

本试剂盒是将 RNA 合成 cDNA，然后再对此 cDNA 进行扩增的试剂盒。RNA 的纯度会影响 cDNA 的合成量，而制备 RNA 的关键是要抑制细胞中的 RNA 分解酶和防止所用器具及试剂中的 RNA 分解酶的污染。因此，在实验中必须采取以下措施：戴一次性干净手套；使用 RNA 操作专用实验台；在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶的污染。

【使用器具】

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。

（1）用 0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在 37℃下处理 12 小时。

（2）然后在 120℃下高压灭菌 30 分钟以除去残留的 DEPC。

另外，试验台、实验器具、tube 等可使用 RNase-OFF®（Code No. 9037）去除 RNase。RNA 实验用的器具和仪器建议专门使用，不要用于其它实验。

【RNA 样品的制备方法】

从培养细胞、组织中提取高纯度 RNA 时，可以使用柱式法 NucleoSpin RNA（Code No.740955.10/.50/.250）和 AGPC 法的简便试剂 RNAiso Plus（Code No. 9108/9109）。血液中 Total RNA 的提取可以使用 NucleoSpin RNA Blood（Code No. 740200.10/.50）。从 Total RNA 中获得 mRNA，使用 *Oligotex-dT30 <Super>*（Code No. W9021）或者 *Oligotex-dT30 <Super>* mRNA Purification Kit (From Total RNA)（Code No. 9086），可以快速且有效地回收 mRNA。

## ● PCR 扩增产物的电泳、克隆和限制酶酶切相关说明

1. 扩增产物的电泳

   使用本试剂盒扩增得到的 PCR 产物进行电泳时，推荐使用 TAE Buffer。使用 TBE Buffer 进行电泳有时结果不好。

2. PCR 产物的克隆

   使用本试剂盒扩增得到的 PCR 产物大部分都是平滑末端，可以直接（必要时 PCR 产物经磷酸化）与平滑末端的去磷酸化载体进行连接。平滑末端载体的克隆可通过 Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End)（Code No. 6027）实现。

   使用本制品扩增的 PCR 产物不能直接与 T-Vector 连接，需要在 3’末端加 dA。此时，可使用 Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR（Code No. 6019）。

3. PCR 产物的限制酶酶切

   对 PCR 产物进行限制酶酶切时，首先要将 PCR 产物进行苯酚/氯仿抽提除去体系中的蛋白质。特别是使用形成 3’突出末端的限制酶（如 *Pst* Ⅰ等）时，如果 PrimeSTAR GXL(用于 1step RT-PCR)的

3’→5’Exonuclease 活性残留，在进行限制酶处理时会将 3’突出末端切掉。

## ● 关联产品

PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit（Code No. 6210A/B）
PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit（Code No. 6110A/B）
PrimeScript™ II Reverse Transcriptase（Code No. 2690A/B/C）
PrimeScript™ Reverse Transcriptase（Code No. 2680A/B/C）
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase（Code No. R045A/B）
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase（Code No. R050A/B）
PrimeScript™ RT-PCR Kit（Code No. RR014A/B）
PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2（Code No. RR055A/B）
PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2（Dye Plus）(Code No. RR057A/B）
PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit（Code No. R022A/B）
PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit（Code No. R023A/B）
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient（Code No. TP600）
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch*（Code No. TP350）
Agarose L03「TAKARA」(Code No. 5003/5003B）
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve（Code No. 5810A）
RNase-OFF®（RNase污染去除溶液）(Code No. 9037）
NucleoSpin RNA（Code No. 740955.10/.50/.250）
RNAiso Plus（Code No. 9108/9109）
NucleoSpin RNA Blood（Code No. 740200.10/.50）
*Oligotex-dT30 <Super>*（Code No. W9021A/B）
*Oligotex-dT30 <Super>* mRNA Purification Kit (From Total RNA)（Code No. 9086）
Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®（Code No. 6019）
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End)（Code No. 6027）

PrimeSTAR is a registered trademark of Takara Bio Inc.
RNase-OFF is a registered trademark of PureBiotech, LLC.
Thermal Cycler Dice, PrimeScript and PrimeGel are trademarks of Takara Bio Inc.

注意
本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。
未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。
如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。
您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。
所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685，87641686

4006518761，4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: https://www.takarabiomed.com.cn

v202110Da