

Code No. RR014A

研究用

Takara

PrimeScript™ RT-PCR Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	2
● 原 理	2
● 试剂盒特点	3
● 使用注意	3
● 实验操作	4
● PCR 反应条件	6
● 实验例	6
● RNA 样品制备	7
● 关联产品	7

● 制品说明

PCR (Polymerase Chain Reaction; 聚合酶链式反应) 是一种使用两条引物在目的DNA序列两侧扩增特异性DNA片段的过程。它是一种体外扩增DNA的简单而有效的方法, 但RNA不能直接被扩增。经过反转录酶的作用把RNA反转录成cDNA后, 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 RT-PCR Kit是具有良好的延伸性能与高扩增效率的2 Step RT-PCR试剂盒。反转录反应使用了Takara Bio Inc.特别开发的M-MLV由来的新型反转录酶PrimeScript RTase; PCR反应使用了扩增性能良好的Hot Start 型DNA聚合酶 *TaKaRa Ex Taq* HS。本试剂盒具有以下优点:

1. 进行高效的RT-PCR扩增。
2. 在标准的RNA反转录反应温度(42°C)下, 便可使具有复杂结构的RNA进行良好的延伸, 可以避免RNA在高温条件下的降解。
3. 能有效抑制非特异性的PCR扩增。

本试剂盒含有反转录反应及PCR扩增反应所需的全部试剂。

● 制品内容 (50 次量*1)

1. PrimeScript RTase (for 2 Step)	25 μ l
2. 5X PrimeScript Buffer	200 μ l
3. RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	25 μ l
4. dNTP Mixture (10 mM each)	150 μ l
5. Oligo dT Primer (2.5 μ M)	50 μ l
6. Random 6 mers (20 μ M)	50 μ l
7. <i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/ μ l)	25 μ l
8. 10X PCR Buffer II	250 μ l
9. Control F-1 Primer*2 (20 μ M)	10 μ l
10. Control R-1 Primer*3 (20 μ M)	10 μ l
11. Positive Control RNA (2×10^5 copies/ μ l)	20 μ l
12. RNase Free dH ₂ O	1 ml

*1 反转录反应 20 μ l、PCR 反应 50 μ l 体系时可使用 50 次。

*2 Positive Control RNA 用上游引物。

*3 Positive Control RNA 用下游引物。

【各种引物序列】

引物名称	各引物序列
Random 6 mers	pd (N) ₆
Oligo dT Primer	Takara Bio 特别设计的 dT 区域*4
Control F-1 Primer	5' -CTGCTCGCTTCGCTACTTGGA-3'
Control R-1 Primer	5' -CGGCACCTGTCCACGAGTTG-3'

*4 该序列和 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (Code No. RR019A/B)的 Oligo dT Adaptor Primer 不同, 不含有与 M13 Primer M4 匹配的序列。

【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, 其 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。

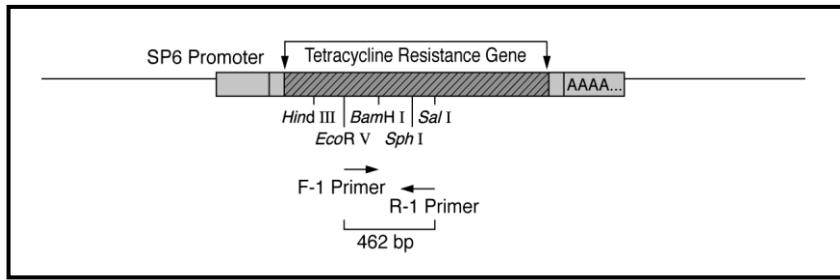


图 1. Positive Control RNA: 使用 Control Primer 可以扩增 462 bp 的 DNA 片段

Kit 外所需试剂和仪器:

1. DNA 扩增仪

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (Code No. TP600), etc.

2. 琼脂糖凝胶

Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003/5003B)

PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A), etc.

3. 电泳仪

4. 小型离心机

5. 移液枪和枪头 (高压灭菌)

● 保存: -20°C

● 原理

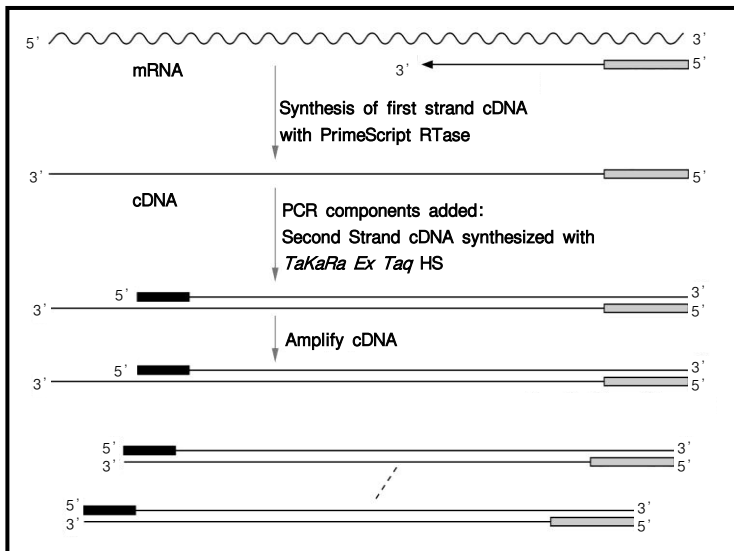


图 2. PrimeScript RT-PCR Kit 原理图

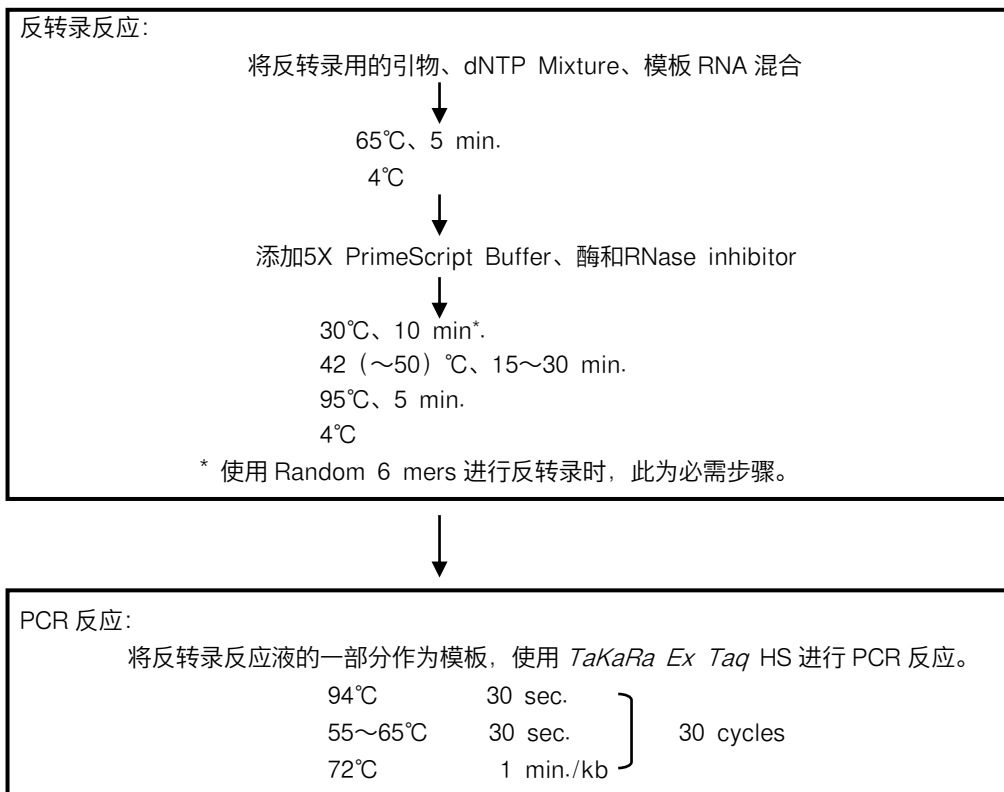


图 3. PrimeScript RT-PCR Kit 的操作流程

PrimeScript RT-PCR Kit 首先用 PrimeScript RTase 将 RNA 合成 cDNA, 再取一部分 1st strand cDNA 作为模板, 由 *TaKaRa Ex Taq HS* 进行 PCR 扩增。将 RNA 反转录成 cDNA 的引物可以使用 Random 6 mers、Oligo dT Primer 或特异性下游引物。

● 试剂盒特点

RNA 模板	适用于所有 RNA
扩增片段大小	~12 kb
反转录酶	PrimeScript RTase (反转录反应最适温度 42°C)
DNA Polymerase	<i>TaKaRa Ex Taq HS</i>
RNase Inhibitor	Kit 中含有
合成第一条 cDNA 链的引物	Random 6 mers、Oligo dT Primer 或特异性下游引物

● 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) 当同时需要进行数次 RT-PCR 反应时, 应先配制各种试剂的混合液, 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) 用 PrimeScript RTase、RNase Inhibitor、*TaKaRa Ex Taq HS* 等酶类时, 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) 酶制品应在实验前从-20℃中取出，使用后也应立即放入-20℃保存。
- 4) 为了防止 Positive Control RNA 分解，应尽量避免反复冻融。有条件的实验室最好保存于-70℃~-80℃。
- 5) 分装试剂时务必使用新的枪头，以防止样品间污染。

【反转录引物的选择】

反转录引物的选择，应结合实验的具体情况，选择以下三种引物，即：Random 6 mers、Oligo dT Primer 或特异性下游引物。对没有发夹结构的短链 mRNA，上述三种引物都可以使用；一般情况下的反转录引物的选择请参照以下说明。

Random 6 mers	适用于长的或具有 Hairpin 构造的 RNA。包括 rRNA、mRNA、tRNA 等在内的所有 RNA 的反转录反应都可使用本引物。
Oligo dT Primer	适用于具有 PolyA Tail 的 RNA。(注意：原核生物的 RNA、真核生物的 rRNA、tRNA 以及某些种类的真核生物的 mRNA 等不具有 PolyA Tail)。
特异性下游引物 (PCR 时的下游引物)	必须与模板序列互补，需了解 Target 序列。

● 实验操作

1. Template RNA 变性及反转录反应

① 配制下列反应混合液。

试剂	使用量
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
Oligo dT Primer (2.5 μM) or Random 6 mers (20 μM) or Specific Primer (2 μM) *1	1 μl
Template RNA *2 (or Positive Control RNA)	2 μl
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μl

*1 合成 cDNA 的引物可结合实际情况从 Oligo dT Primer、Random 6 mers、Specific Primer 中任选一种（对于 Control RNA，使用 R-1 Primer），请参照“反转录引物的选择”。

*2 Template RNA 最多可加至 8 μl，当使用 Total RNA 时，最多可加至 5 μg (推荐使用量：100 pg~1 μg)。

② 在 PCR 仪上进行变性、退火反应。

65℃ 5 min.

4℃

NOTE：变性、退火操作有利于模板 RNA 的变性以及反转录引物和模板的特异性退火，可提高反转录反应效率。

③ 在上述反应管中配制下列反转录反应液。

试剂	使用量
上述变性、退火后反应液	10 μ l
5X PrimeScript Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0.5 μ l
PrimeScript RTase (for 2 Step)	0.5 μ l
RNase Free dH ₂ O	5 μ l
Total Volume	20 μ l

④ 在 PCR 仪上按下列条件进行反转录反应。

(30°C 10 min.) *³
 42°C (~50°C) 15~30 min.
 95°C 5 min.*⁴
 4°C

* 3 当反转录反应引物为 Random 6 mers 时，在 42°C 反应前，需将混合物在 30°C 反应 10 分钟。此操作可使 Random 6 mers 在 30°C 下和模板 RNA 充分退火、延伸，增加反转录效率。

* 4 进行长片段 DNA 扩增时，为了保证 1st strand cDNA 完整，请进行 70°C、15 min 的失活反应。

NOTE: PrimeScript RTase 对具有复杂二级结构的模板同样具有良好的延伸性能，通常可在 42°C 下进行反应。使用特异性下游引物进行反转录时，有时会因错配而产生非特异性扩增。此时可将温度升到 50°C，可能会减少非特异性扩增。

2. PCR 反应。

① 按下列组成配制 PCR 反应液。

试剂	使用量	Final concentration
10X PCR Buffer II	5 μ l	1X
dNTP Mixture (10 mM each)	2 μ l	400 μ M
Upstream Primer (20 μ M) * ⁵ (Sense)	0.5 μ l	0.2 μ M
Downstream Primer (20 μ M) * ⁶ (Anti-sense)	0.5 μ l	0.2 μ M
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/ μ l)	0.5 μ l	
上述的反转录反应液	\leq 5 μ l	
灭菌水	up to 50 μ l	

* 5 Positive Control RNA 使用 F-1 Primer。

* 6 Positive Control RNA 使用 R-1 Primer。

② 按照下面的反应条件进行反应。

一般反应条件。

(A) 三步法 PCR 的反应条件:

94°C 30 sec.
 55~65°C 30 sec.
 72°C 1 min./kb } 30 cycles

(B) 两步法 PCR 的反应条件:

98°C 10 sec.
 68°C 1 min./kb } 30 cycles

Positive Control RNA*7的反应条件。

94°C	30 sec.	} 30 cycles
60°C	30 sec.	
72°C	1 min.	

* 7 在进行 PCR 扩增时使用 Control Primer F-1 和 R-1 引物，都可以得到 462 bp 的 PCR 扩增产物。

● PCR 反应条件

■ 退火温度

Control RNA 的退火温度设定为 60°C，检测样品的适宜退火温度可以在 55~65°C 间进行研讨。有时也可将退火温度范围扩大到 45~65°C 进行研讨。

■ 延伸时间

延伸时间根据目的片段的长度而改变，通常情况下 *TaKaRa Ex Taq* HS 在 72°C 时的设定标 1 kb/min.。

■ 循环圈数

cDNA 少时，可进行 40~50 Cycles。

■ 使用本制品扩增得到的 PCR 产物 3' 端附有一个“A”碱基，因此可直接克隆于 T-Vector 中。也可以在末端平滑化和磷酸化后克隆到平滑末端载体，可使用 Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End)(Code No. 6027) 实现平滑末端的载体克隆。

● 实验例

1. 以 Human Heart Total RNA 和 HL60 Total RNA 为模板，进行 RT-PCR 反应，扩增出不同长度目的基因片段。

反转录反应；1 μg Total RNA/20 μl 的反转录体系

↓

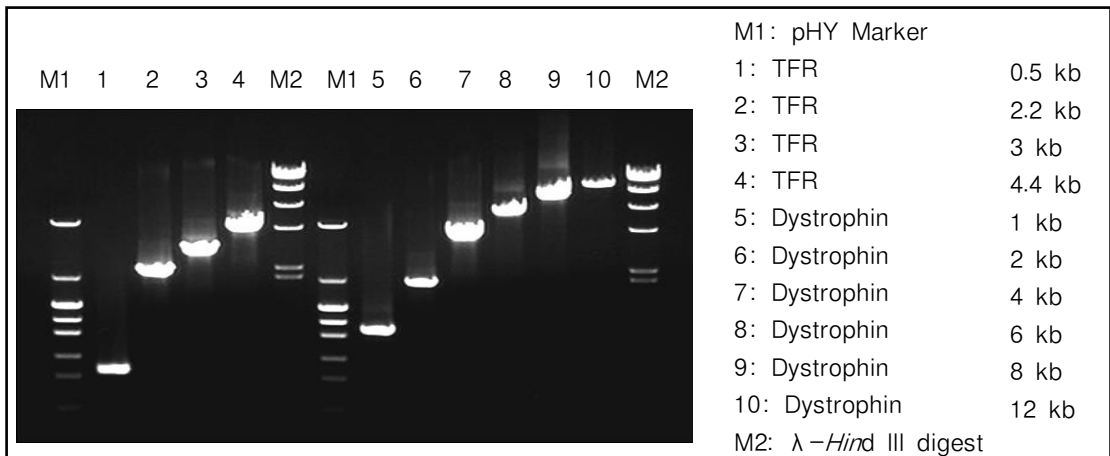
PCR 反应；2 μl 的反转录反应液/50 μl 的 PCR 反应体系
(Total RNA 在 PCR 反应中的用量大约是 100 ng/50 μl)

目的基因	使用的 Total RNA
Dystrophin 基因	Human Heart
Transferrin receptor (TFR 基因)	HL60 cell

PCR 反应条件：

0.5~6 kb		8~12 kb	
94°C	1 min.	94°C	1 min.
94°C	30 sec.	98°C	10 sec.
55°C	30 sec.	68°C	8 min. or 15 min.
72°C	1 min./kb	} 30 cycles	

电泳结果如下。结果显示，0.5~12 kb DNA 片段都得到了良好的 RT-PCR 扩增。

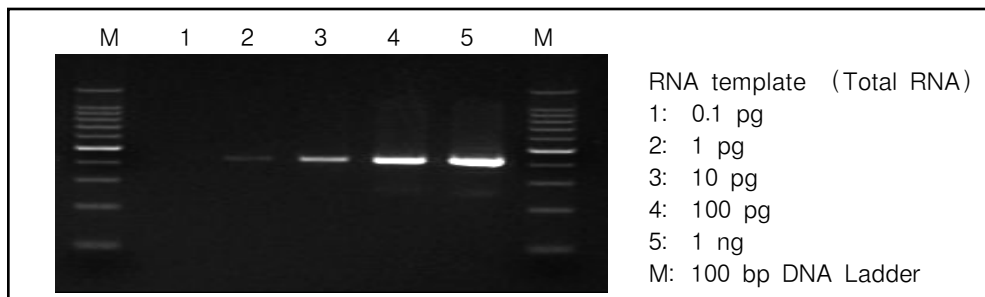


2. 以 HL60 Total RNA 作模板, 以 Oligo dT Primer 作为反转录引物, 进行 RT-PCR 反应, 扩增 GAPDH 基因的 428 bp 的 DNA 片段, 进行 RT-PCR 检出灵敏度实验。

Target: GAPDH 428 bp

PCR 反应条件:

94°C	1 min.	} 40 cycles
94°C	30 sec.	
55°C	30 sec.	
72°C	1 min.	



电泳结果显示, 最低的 Total RNA 检出量为 1 pg。

● RNA 样品制备

本试剂盒是把 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水、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°C 下处理 12 小时。
- (2) 然后在 120°C 下高压灭菌 30 分钟以除去残留的 DEPC。

建议使用 RNase-OFF[®] (Code No. 9037) 去除实验台、仪器、tube 等上的 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。

【制备方法】

使用简单的 RNA 纯化方法即可获得满足于 RT-PCR 反应的 RNA（只需少量的 RNA 便可进行 RT-PCR 反应）。但为了保证实验的成功率，建议使用 GTC 法（异硫氰酸胍法）制备的高纯度 RNA。

● 关联产品

PrimeScript™ Reverse Transcriptase (Code No. 2680A/B/C)
PrimeScript™ II Reverse Transcriptase (Code No. 2690A/B/C)
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)
PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (Code No. R022A/B)
PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Code No. 6110A/B)
PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Code No. 6210A/B)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ (Gradient) (Code No. TP600)
Agarose L03 (Code No. 5003/5003B)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A)
RNase-OFF® (Code No. 9037)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)

TaKaRa Ex Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.

RNase-OFF is a registered trademark of PureBiotech, LLC.

PrimeScript, Thermal Cycler Dice, PrimeGel, and TaKaRa RNA PCR 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>

v202108Da