

Code No. RR019A

研究用

TaKaRa

TaKaRa RNA PCR Kit
(AMV) Ver.3.0

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● Kit 外所需材料	2
● 保 存	2
● RNA PCR 原理	2
● 试剂盒特点	3
● RNA 样品制备	3
● 使用注意	4
● 实验操作	5
● 参考文献	8
● 关联产品	8

● 制品说明

PCR (Polymerase Chain Reaction; 聚合酶链式反应) 是一种体外扩增DNA的简单而有效的方法。虽然原理上PCR法是扩增DNA, RNA不能被扩增, 但是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。

TaKaRa RNA PCR Kit Ver.3.0是使用AMV (Avian Myeloblastosis Virus) 由来的反转录酶将RNA合成cDNA, 然后在同一反应管中使用Hot Start PCR用 *TaKaRa Ex Taq* HS DNA聚合酶扩增此cDNA的RT-PCR试剂盒。本试剂盒含有从RNA到cDNA, 然后使用PCR法扩增此cDNA所需的全部试剂, 可实现简单高效的RNA分析。

本试剂盒中的Oligo dT-Adaptor Primer的特殊设计, 大大地提高了Poly(A)·RNA 3' 端区域的cDNA合成效率。Hot Start PCR用DNA聚合酶 *TaKaRa Ex Taq* HS的应用, 避免扩增前由于错配或引物二聚体产生的非特异性扩增。

● 制品内容 (100 次量*1)

1. AMV Reverse Transcriptase XL (5 U/μl) (Avian Myeloblastosis Virus 来源)	50 μl
2. RNase Inhibitor (40 U/μl)	25 μl
3. Random 9 mers*2 (50 pmol/μl)	50 μl
4. Oligo dT-Adaptor Primer*2 (2.5 pmol/μl)	50 μl
5. RNase Free dH ₂ O	1 ml
6. <i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/μl)	25 μl
7. M13 Primer M4*2 (20 pmol/μl)	50 μl
8. 10×RT Buffer [100 mM Tris-HCl (pH8.3), 500 mM KCl]	1 ml
9. 5×PCR Buffer	1 ml
10. dNTP Mixture (各 10 mM)	150 μl
11. MgCl ₂ (25 mM)	1 ml
12. Control R-1 Primer*2 (20 pmol/μl) (Positive Control RNA 下游引物)	25 μl
13. Control F-1 Primer*2 (20 pmol/μl) (Positive Control RNA 上游引物)	25 μl
14. Positive Control RNA*3 (2×10 ⁵ copies/μl) (Transcribed poly(A) ⁺ RNA of pSPTet3 plasmid)	25 μl

*1: 1 次反应即 10 μl RT 及 50 μl PCR

*2: 引物序列

引物名称	各引物序列
Random 9 mers	dp (5' -NNNNNNNNN-3')
Oligo dT-Adaptor Primer	包含 dT 区域及 M13 Primer M4 序列
Control F-1 Primer	5' -CTGCTCGCTTCGCTACTTGGA-3'
Control R-1 Primer	5' -CGGCACCTGTCCTACGAGTTG-3'
M13 Primer M4	5' -GTTTTCCAGTCACGAC-3'

*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，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。Control RNA（约1.4 kb）是带有30个A碱基的具有Poly(A)⁺尾的RNA。当把Control RNA经RT-PCR合成的双链cDNA插入质粒时，该质粒便可获得四环素抗性。Control RNA简图见图1。

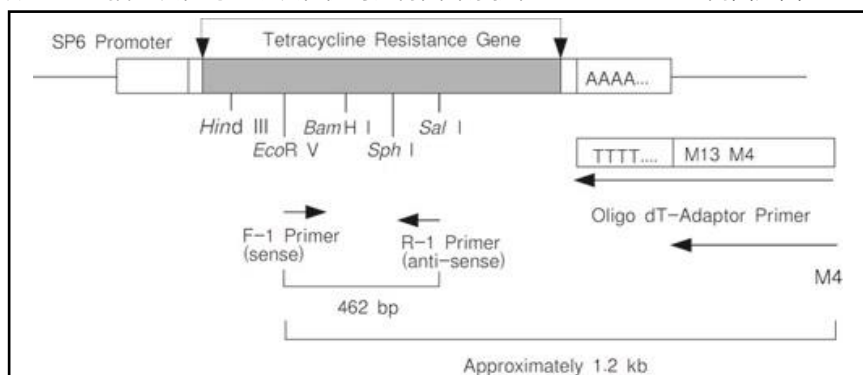


图 1. Positive Control RNA: 使用各种引物所能扩增的 DNA 片段

● Kit 外所需材料

1. 试剂

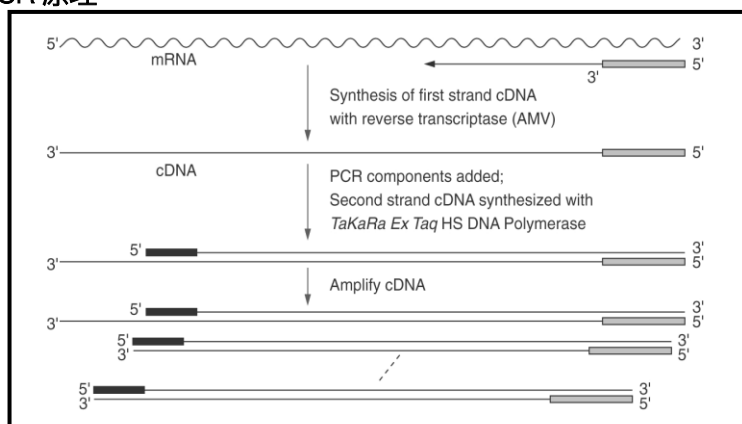
- PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A)
- Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003/5003B)
- PrimeGel Agarose LE 1-20K GAT (Code No. 5801A)

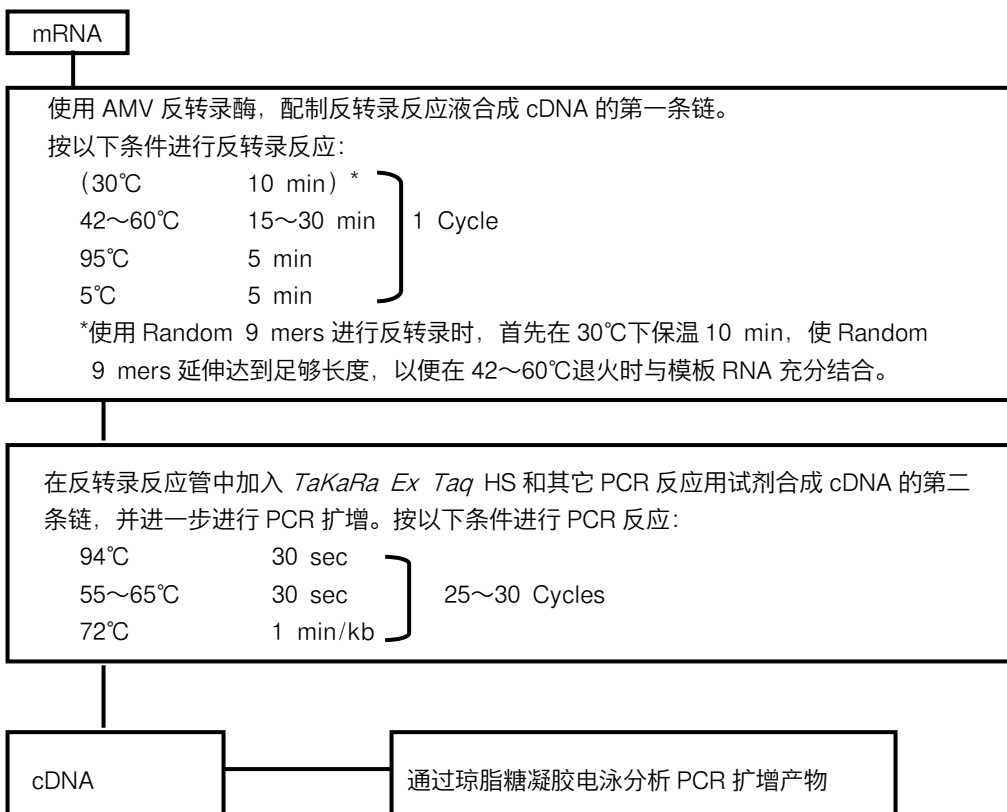
2. 仪器

- PCR 仪，如 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch* (Code No. TP350)
- 琼脂糖凝胶电泳仪，如 Mupid-2plus (Code No. M-2P)
Mupid-exU (Code No. EXU-1)
Mupid-One (Code No. O1-01)
- 小型台式离心机
- 移液枪和枪头（高压灭菌）

● 保 存: -20°C

● RNA PCR 原理





本试剂盒使用 AMV 由来的反转录酶由 RNA 合成 cDNA，并可在同一反应管中使用 *TaKaRa Ex Taq HS* 扩增此 cDNA。Random 9 mers、Oligo dT-Adaptor Primer 或特异性下游引物等均可作为反转录引物用于 cDNA 合成。Oligo dT-Adaptor Primer 同时适用于 3' -RACE 实验。

● 试剂盒特点

RNA 模板	适用于所有 RNA	
扩增片段大小	≤5 kb	
反转录酶	AMV Reverse Transcriptase XL	
DNA 聚合酶	<i>TaKaRa Ex Taq HS</i>	
RNase Inhibitor	试剂盒中含有	
合成 cDNA 第一条链的引物	Random 9 mers Oligo dT Primer 特异性下游 PCR Primer	} 可供选择
3' -RACE 法	3' -RACE 反应时使用 Oligo dT-Adaptor Primer，PCR 反应时下游引物使用 M13 Primer M4	
操作	在同一反应管中进行（反转录酶在进行 PCR 反应前须进行高温失活）	

● 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°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。

RNA 实验用的器具和仪器建议专门使用，不要用于其它实验。

【试剂配制】

用于 RNA 实验的试剂，须使用干热灭菌 (180°C, 60 min) 或用上述方法进行 DEPC 水处理灭菌后的玻璃容器盛装 (也可使用 RNA 实验用的一次性塑料容器)，使用的无菌水须用 0.1% 的 DEPC 处理后进行高温高压灭菌。

RNA 实验用的试剂和无菌水都应专用，避免混用后交叉污染。

【制备方法】

想要制备高纯度的 RNA，尽量去除多糖和蛋白质等杂质，因为这些杂质可能会抑制 cDNA 合成反应。另外，还需防止基因组 DNA 污染。

收集样品后，应尽快从组织和细胞中制备 RNA。如果无法做到这一点，请将样品保存在 -80°C 或液氮中。可以使用硫氰酸胍-苯酚-氯仿法 (AGPC 法) 或用商业化的试剂或试剂盒分离和纯化 RNA。

如：RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250)

【RNA 样品量】

使用本试剂盒进行 RT-PCR 反应时，每次反应所需的最适 Total RNA 量约为 500 ng。

● 使用注意

- 1) 当同时需要进行数次反转录反应或 PCR 反应时，应先配制各种试剂的混合液 (Master Mix；其中包括 RNase Free dH₂O、Buffer、dNTP Mixture、MgCl₂ 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 Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、*TaKaRa Ex Taq* HS 酶等酶类时，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；由于酶保存液粘度高，分取时应慢慢吸取。
- 3) 酶制品应在实验前才从 -20°C 中取出，使用后也应立即放回 -20°C 中保存。
- 4) 分装试剂时务必使用新的枪头 (Tip)，以防止样品间污染。
- 5) 合适的 PCR 条件，因 PCR 扩增仪的不同而不同，所以在您的样品之前最好先试做一下 Control 反应，以确定合适的 PCR 条件。
- 6) 引物选择
用于反转录的引物可视实验具体情况选择 Random 9 mers、Oligo dT-Adaptor Primer 或特异性下游引物。对于不具有 Hairpin 构造的短链 mRNA，3 种引物中的任何一种都可以使用，但一般应按以下方法进行选择。

Random 9 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。 用 Random 9 mers 合成的 cDNA 进行 PCR 反应时，必须使用特异性引物。
Oligo dT Primer	适用于具有 Poly(A) ⁺ Tail 的 RNA。(注意：原核生物的 RNA、真核生物的 rRNA 及 tRNA 以及某些种类的真核生物的 mRNA 不具有 Poly(A) ⁺ Tail)。本 Primer 设计巧妙，反转录效率高。反转录反应后，可用 M13 Primer M4 进行 3' -RACE 实验。
特异性下游 PCR Primer (PCR 时的下游引物)	因其必须与模板序列互补，所以只适用于 Target 序列已知的情况。

● 实验操作

1. 一般 RT-PCR 实验

A. 反转录反应

- ① 按下列组成在 tube 中配制反转录反应液。合成 cDNA 的引物可结合实际情况从 Oligo dT-Adaptor Primer, Random 9 mers 或特异性下游引物中任选一种 (control experiment 用 control R-1 primer)。参看“使用注意”选择引物。

试剂	使用量	Final conc.
MgCl ₂	2 μl	5 mM
10X RT Buffer	1 μl	1X
RNase Free H ₂ O	3.75 μl	
dNTP Mixture	1 μl	1 mM
RNase Inhibitor	0.25 μl	1 U/μl
AMV Reverse Transcriptase XL ^{*3}	0.5 μl	0.25 U/μl
Random 9 mers 或 Oligo dT-Adaptor Primer 或 Specific downstream PCR primer(R-1 Primer)	0.5 μl	2.5 μM 或 0.125 μM 或 1.0 μM
Positive Control RNA 或 Experimental Sample	1 μl	[2 × 10 ⁵ copies] 或 [≤500 ng total RN
Total	10 μl per	

- ② 按以下条件进行反转录反应。

(30°C	10 min) ^{*2}	} 1 Cycle
42°C~60°C ^{*3}	15~30 min	
95°C	5 min ^{*1}	
5°C	5 min	

- *1 AMV RTase能与cDNA结合，会阻碍PCR扩增反应。因此，在PCR反应前，必须进行95°C 5分钟加热使AMV RTase失活。反应液中Reverse Transcriptase的浓度增加会使失活变得困难，在使用长链RNA进行反转录反应时，不要增加Reverse Transcriptase的量，可将延伸反应时间延长。
- *2 使用 Random 9 mers 时，先进行 30°C 保温 10 min，使 Random 9 mers 达到足够长度，以便在 42°C~60°C 退火时与模板 RNA 充分结合。

- *3 AMV 由来的 Reverse Transcriptase, 即使在 60°C 下也能进行反转录反应。但在反转录长链 RNA (>2 kb) 时, 建议在 42°C 左右进行。当 Positive Control RNA 作为模板时, 建议在 50°C 进行反转录。

B. PCR 反应

- ① 按下列组成配制 PCR 反应液*。

试剂	使用量	Final conc.(per 50 μl mixture)
5X PCR Buffer	10 μl	1X
灭菌水	28.75 μl	
<i>TaKaRa Ex Taq HS</i>	0.25 μl	1.25 U/50 μl
Upstream PCR primer (F-1 Primer for Control RNA)	0.5 μl	0.2 μM (20 pmol)
Downstream PCR Primer*1 [for Control RNA ,R-1 Primer or M13 Primer M4 (反转录使用 Oligo dT-Adaptor Primer 时)]	0.5 μl	0.2 μM (20 pmol)
Total	40 μl per	

*1: 反转录反应时如使用了特异性下游 PCR 引物, 可用 0.5 μl 灭菌水代替下游 PCR 引物。

- ② 把 40 μl 的 B-① 的反应液加入到 A-② 的反转录反应结束后的 PCR 反应管中, 轻轻混匀。
③ 离心约 10 秒。
④ 按以下条件进行 PCR 反应*2。

Standard Condition		} 25~30 Cycles	Positive Control RNA		} 30 Cycles
94°C	30 sec		94°C	30 sec	
55~65°C	30 sec	60°C	30 sec		
72°C	1 min/kb	72°C	1 min		

*2: PCR 条件设定

■退火温度

对于 control RNA 可设定退火温度为 60°C, 但可根据实际样品情况调整退火温度, 通常可以在 55°C~65°C 范围内进行反应条件研讨。有时可以在更广范围内 (45°C~65°C) 进行条件研讨。

■延伸时间

延伸时间因目的序列长度的不同而不同, 通常 *TaKaRa Ex Taq HS* 按 72°C 1 kb/min 设定延伸时间。

■循环次数

cDNA 量较少时, 循环次数可增加为 40~50 次。

■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。

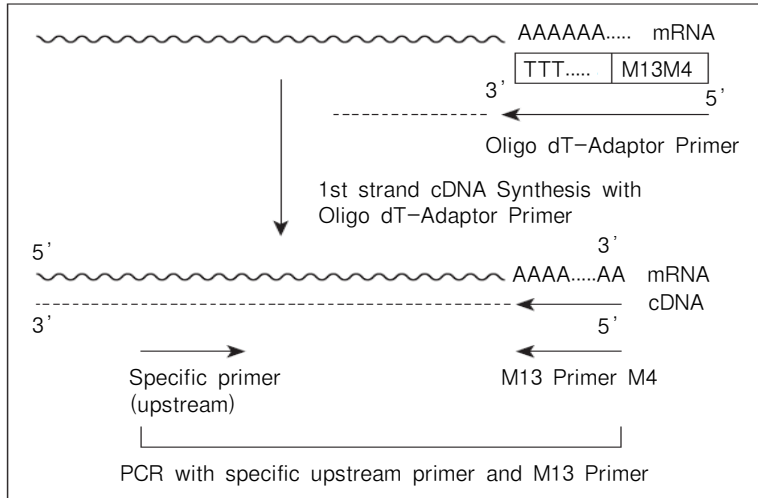
- ⑤ 反应结束后, 取 PCR 反应液 (5~10 μl) 进行琼脂糖凝胶电泳, 确认 PCR 反应产物*3。

*3: 如果此 PCR 产物需用于以后实验, 须将 PCR 产物冷冻保存。

使用 Control RNA 时扩增的 DNA 片段大小

反转录反应引物	PCR 引物	扩增片段
Oligo dT-Adaptor Primer	F-1/M13 Primer M4 或 F-1/R-1	约 1.2 kb 462 bp
Random 9 mers	F-1/R-1	462 bp
Control R-1 Primer	F-1/R-1	462 bp

2. 3' -RACE 法实验



A. 反转录反应

① 按下列组成配制反转录反应液。

试剂	使用量	Final conc.
MgCl ₂	2 μl	5 mM
10X RT Buffer	1 μl	1X
RNase Free H ₂ O	3.75 μl	
dNTP Mixture	1 μl	1 mM
RNase Inhibitor	0.25 μl	1 U/μl
Reverse Transcriptase	0.5 μl	0.25 U/μl
Oligo dT-Adaptor Primer	0.5 μl	0.125 μM
total RNA(500 ng/μl)	1 μl	500 ng/10 μl
Total	10 μl	

② 按以下条件进行反转录反应。

42-60°C 30 min
 95°C 5 min
 5°C 5 min } 1 Cycle

B. PCR 反应

① 按以下组成配制 PCR 反应液。

试剂	使用量	Final conc.(per 50 μ l mixture)
5X PCR Buffer	10 μ l	1X
灭菌水	28.75	
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS	0.25 μ l	1.25 U/50 μ l
M13 Primer M4	0.5 μ l	0.2 μ M
Specific upstream primer (20 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M
Total	40 μ l	per sample

② 把 B-①配制的 40 μ l PCR 反应液加入至 A-②的反转录反应管中。

③ 按以下条件进行 PCR 反应。

94°C	30 sec	} 30 Cycles
55°C	30 sec	
72°C	0.5–5 min	

④ 反应结束后，取 5 μ l 的 PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 反应产物。

● 参考文献

- 1) Kawasaki E S and Wang A M. PCR Technology (Erlich, H. A. ed.), Stockton Press. (1989) 89–97.
- 2) Lynas C, Cook S D, Laycock K A, Bradfield J W B, and Maitland N J. *J Pathology*. (1989) **157**: 285–289.
- 3) Frohman M A, Dush M K, and Martin G R. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1988) **85**: 8998–9002.

● 关联产品

Reverse Transcriptase XL (AMV) for RT-PCR (Code No. 2630A)
Recombinant RNase Inhibitor (Code No. 2313A/B)
Ribonuclease Inhibitor (Porcine liver) (Code No. 2311A/B)
TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version (Code No. RR006A/B)
Random Primer (pd(N)₉) (Code No. 3802)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A)
Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003/5003B)
PrimeGel Agarose LE 1–20K GAT (Code No. 5801A)
TaKaRa Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
Mupid-2plus (Code No. M-2P)
Mupid-exU (Code No. EXU-1)
Mupid-One (Code No. O1-01)

Takara Ex Taq is a resistered trademark of Takara Bio Inc.
Thermal Cyclser Dice 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.takara-bio.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>

v202007Da