

Code No. TCH026

研究用

---

**TaKaRa**

PrimeScript™ IV 1st strand cDNA  
Synthesis Kit with gDNA Eraser

---

说明书

# 目 录

| 内 容         | 页 码 |
|-------------|-----|
| ● 制品说明      | 1   |
| ● 制品内容      | 1   |
| ● 保 存       | 2   |
| ● 操作方法      | 2   |
| ● RT-PCR 反应 | 3   |
| ● RNA 样品的制备 | 3   |
| ● 关联产品      | 3   |

## ● 制品说明

PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Kit with gDNA Eraser 是可以除去基因组 DNA, 并从 total RNA 或 polyA<sup>+</sup> RNA 起始的 1st strand cDNA 的试剂盒。试剂盒中使用了具有较强 DNA 分解活性的 gDNA Eraser, 42°C, 2 min 即可除去基因组 DNA, 之后添加含有完全抑制 DNA 分解活性成分的反转录反应试剂, 进行反转录反应。由于基因组去除试剂和反转录反应试剂均已预混成 Premix 试剂, 操作简便, 可以迅速地完成从基因组 DNA 去除到 cDNA 合成的反应。

本制品通过添加辅助蛋白质改良了 Buffer 的组成, 省去了以往进行反转录反应前的 RNA 变性操作。此外, PrimeScript IV RTase 相比于以往制品, 能在更短时间内合成 cDNA。通过提高耐热性使反转录反应可以在高温下进行, 在使用 Gene Specific Primer 合成 cDNA 的效率和特异性的提升上发挥了重要作用。本制品合成的 1st strand cDNA 适用于 2nd strand cDNA 合成、杂交、PCR 法扩增, 全长 cDNA 文库的制备等需要高品质全长 cDNA 的应用。另外, 通过试剂盒中附带的 Random 6 mers, 可以从不含有 polyA<sup>+</sup> 的 RNA 起始合成 cDNA, 同时也适用于利用 Real Time PCR 方法进行基因表达分析的 cDNA 合成。

## ● 制品内容 (20 μl 反应×50 次量)

|                                                                |        |
|----------------------------------------------------------------|--------|
| 5×gDNA Eraser Premix* <sup>1</sup>                             | 100 μl |
| 5×PrimeScript IV cDNA Synthesis Mix II * <sup>2</sup>          | 200 μl |
| 5×PrimeScript IV cDNA Synthesis Mix II (RTase-) * <sup>3</sup> | 60 μl  |
| Random 6 mers (50 μM) * <sup>4</sup>                           | 100 μl |
| RNase Free H <sub>2</sub> O                                    | 1 ml×2 |

### 【各引物序列】

| 引物名称            | 引物序列                                |
|-----------------|-------------------------------------|
| Random 6 mers   | pd(N)6                              |
| Oligo dT Primer | Takara 特别开发的 dT 区域的序列* <sup>5</sup> |

- \*1: 5×gDNA Eraser Premix 成分是后续反转录反应所必需的, 请务必进行基因组 DNA 的除去反应。其中含有 RNase Inhibitor。
- \*2: 含有 PrimeScript IV RTase、Oligo dT Primer、dNTP Mixture 及反应 Buffer (含 Mg<sup>2+</sup>)。
- \*3: 5×PrimeScript IV cDNA Synthesis Mix II (RTase-) 为不加逆转录酶的逆转录阴性对照反应, 可替代 5×PrimeScript IV cDNA Synthesis Mix II 用于检验 RNA 模板中是否有基因组 DNA 残留及基因组 DNA 去除情况。(可选)
- \*4: 不含 polyA 的 RNA 起始 cDNA 的合成及 Real Time PCR 用的 cDNA 的合成, RNA 全部区域 cDNA 的均匀合成等情况下添加至反应液中。
- \*5: 该序列与 TaKaRa RNA PCR™ Kit (AMV) Ver.3.0 (Code No. RR019A/B) 中的 Oligo dT Adaptor Primer 不同, 不含有 M13 Primer M4 的序列。

### 【本制品以外需准备的主要试剂及仪器】

1. 恒温装置  
加热块 (可以用 Thermal cycler)
2. 微量移液器和枪头 (高压灭菌完成)

- 保 存: -20℃

## ● 操作方法

【标准的操作流程】

### 1. 去除基因组 DNA 反应

冰上配制以下反应液

| 试剂                           | 使用量                                                 |
|------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 5×gDNA Eraser Premix         | 2 μl                                                |
| 模板 RNA                       | total RNA: ≤5 μg<br>poly(A) <sup>+</sup> RNA: ≤1 μg |
| RNase Free dH <sub>2</sub> O | X μl                                                |
| Total                        | 10 μl                                               |

轻柔混匀后, 按照以下条件进行反应

42℃ 2 min (或者室温 5 min<sup>\*1</sup>)

4℃

\*1: 室温反应时, 可以延长至 30 分钟。

### 2. 反转录反应

冰上配制以下反应液

| 试剂                                     | 使用量                   |
|----------------------------------------|-----------------------|
| 步骤 1 的反应液                              | 10 μl                 |
| 5×PrimeScript IV cDNA Synthesis Mix II | 4 μl                  |
| Random 6 mers (50 μM)                  | ≤2 μl <sup>*2*3</sup> |
| RNase Free dH <sub>2</sub> O           | X μl                  |
| Total                                  | 20 μl                 |

### 3. 轻柔混匀后, 按照以下条件进行反应

30℃ 10 min (使用 Random 6 mers 时)

42℃ 10–20 min<sup>\*4</sup>

### 4. 95℃, 5 分钟或 70℃15 分钟使酶失活后, 冰上冷却<sup>\*5</sup>。

\*2: 合成 2 kb 以下的 cDNA 时, 推荐 Random 6 mers 的使用量为 1~2 μl; 合成 2 kb 以上的 cDNA 时, 推荐 Random 6 mers 的使用量为 0.4~1 μl。使用 Random 6 mers 时, 请在反应最初添加 30℃, 10 分钟的预热操作。

\*3: 也可以使用 Gene Specific Primer, 此时, 其在反应体系中的终浓度为 0.1 μM。

\*4: PrimeScript IV RTase 对于含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℃ 下进行反应。使用含有复杂高级结构的 RNA 合成 cDNA 时, 尤其是反转录引物使用 Gene Specific Primer 时, 反转录反应温度可在 45–55℃范围内调整。

\*5: 扩增长链 cDNA 时, 为避免对 cDNA 的损伤, 请进行 70℃, 15 分钟的失活处理。

| 试剂                                              | 使用量              |
|-------------------------------------------------|------------------|
| 步骤 1 的反应液                                       | 10 $\mu$ l       |
| 5×PrimeScript IV cDNA Synthesis Mix II (RTase-) | 4 $\mu$ l        |
| Random 6 mers (50 $\mu$ M) (可选)                 | $\leq 2$ $\mu$ l |
| RNase Free dH <sub>2</sub> O                    | X $\mu$ l        |
| Total                                           | 20 $\mu$ l       |

轻柔混匀后，按照以下条件进行反应

30°C 10 min (使用 Random 6 mers 时)  
42°C 10–20 min  
95°C, 5 分钟或 70°C 15 分钟使酶失活后，冰上冷却。

## ● RT-PCR 反应

1st strand cDNA 合成的反应液，可直接作为 PCR 反应的模板使用，此时，其加入量为 PCR 反应液量的 1/10 以下。此外，模板加入量会对 PCR 扩增效率有影响，建议参照使用的 PCR 酶说明书，进行适宜模板量的研讨。

在 RT-PCR 反应中，出现非特异性扩增或无扩增产物时，使用 RNase H 处理 cDNA 反应液可改善 PCR 的扩增效果。关于推荐的 PCR 酶、Real Time PCR 试剂及 RNase H 等，请参见【关联产品】。

## ● RNA 样品的制备

本制品是以 RNA 起始合成 cDNA 的试剂盒。为成功合成 cDNA 需要尽量抑制样品中含有的 RNase 的作用，同时需尽量避免所用器具及试剂中混入 RNA 分解酶。在 RNA 制备的过程中，操作人员必须采取以下措施：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。

### 【试剂】

试剂、灭菌水全部为 RNA 实验专用。

### 【RNA 样品的制备方法】

建议使用 GTC 法(异硫氰酸胍法)制备高纯度 RNA 样品。使用以下的 RNA 提取试剂盒可以在短时间内获得高纯度的 total RNA。RNA 样品最终应溶解于灭菌水或 TE Buffer 中。

RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

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

## ● 关联产品

### 【仪器】

Clontech PCR Thermal Cycler GP (Code No.WN400)

### 【耗材】

0.2 ml single tube

0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (Code No. NJ200)

0.2 ml Single-Tube Dome Cap (Code No. NJ204)

0.2 ml Single-Tube Flat Cap (Code No. NJ205)

0.2 ml 8联 tube & cap

0.2 ml Hi-8-Tube/Dome Cap/Flat Cap (Code No. NJ300/NJ301/NJ302)

TaKaRa PCR Micro Strip 8-Tube/Cap (Code No. 9148/9149)

#### 【RNA 纯化】

RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

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

RNase-free Water (Code No. 9012)

Ribonuclease H (RNase H)(Code No. 2150A/2151)

Recombinant DNase I (RNase-free) (Code No. 2270A/B)

#### 【PCR 酶】

高成功率，高特异性的 PCR：

Tks Gflex™ DNA Polymerase (Code No. R060A/B)

高保真酶：

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase Ver.2 (Code No. R047A/B)

PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Code No. R050A/B)

PrimeSTAR® GXL Premix Fast, Dye plus (Code No. R052A/B)

高灵敏度，高收量的 PCR：

*Premix Taq*™ (*Ex Taq*™ Version 2.0) (Code No. RR003A/B)

长链的扩增：

*TaKaRa LA Taq*® Hot Start Version (Code No. RR042A/B)

#### 【Real Time PCR】

*Premix Ex Taq*™ (Probe qPCR) (Code No. RR390A/B)

Probe qPCR Mix (Code No. RR391A/B)

Probe qPCR Mix, with UNG (Code No. RR392A/B)

Probe qPCR Mix MultiPlus (Code No. RR393A/B)

CoverAll Probe qPCR Mix II-V (Code No. TCH032-TCH035)

TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420S/A/B/L/W)

TB Green® Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B)

TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A/B/L/W)

PrimeSTAR, *TaKaRa Ex Taq*, *TaKaRa LA Taq*, and TB Green are registered trademarks of Takara Bio Inc.

Thermal Cycler Dice, PrimeScript, Tks Gflex, 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.takara-bio.com](http://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。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司制作，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>