

Code No. 6110A

研究用

Takara

PrimeScript™ 1st Strand
cDNA Synthesis Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 本 Kit 以外需准备的主要试剂及仪器	1
● 保 存	1
● 1st Strand cDNA 合成反应	1
● RT-PCR 及 Real Time RT-PCR 反应	2
● 注意事项	3
● 关联产品	3

● 制品说明

本制品是使用 PrimeScript RTase 从 Total RNA 或 PolyA⁺ RNA 合成 1st Strand cDNA 的试剂盒，含有 1st Strand cDNA 合成所需的全部试剂。PrimeScript Reverse Transcriptase 是一种 MMLV (Moloney Murine Leukemia virus) 由来的新型反转录酶。本酶能够有效合成长达 12 kb 的 1st Strand cDNA，即使对富含 GC 的片段或者具有复杂二级结构的 RNA，在常规的反转录温度 42°C 条件下也能得到良好的反转录效果，无需进行高温反转录反应（高温反转录反应会导致 RNA 的降解）。合成的 1st Strand cDNA 可广泛应用于 2nd Strand 合成、杂交、PCR 扩增、Real Time PCR 反应等。

● 制品内容 (50 次量)

1. PrimeScript RTase (200 U/μl)	50 μl
2. 5X PrimeScript Buffer	200 μl
3. RNase Inhibitor (40 U/μl)	25 μl
4. dNTP Mixture (10 mM each)	50 μl
5. Oligo dT Primer (50 μM)	50 μl
6. Random 6 mers (50 μM)	100 μl
7. RNase Free dH ₂ O	1 ml

【引物序列】

引物名称	各引物序列
Random 6 mers	pd(N) ₆
Oligo dT Primer	Takara 特别开发的 dT 序列*

* 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 M13 Primer M4 的序列。

● 本 Kit 以外需准备的主要试剂及仪器

- 水浴锅
DNA 扩增仪可作为替代品
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)。
- 电泳用凝胶
Agarose L03 [TAKARA](Code No. 5003), PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve(Code No. 5810A), etc.
- 电泳仪
- 微量离心机
- 微量移液器和枪头（高压灭菌）

● 保存： -20°C。

● 1st strand cDNA 合成反应

1. 按下表配制反应液：

试剂	使用量
Oligo dT Primer (50 μM) [或 Random 6 mers (50 μM)]	1 μl 或 1 μl (0.4-2 μl) *1
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
Template RNA	total RNA: <5 μg*2 PolyA ⁺ RNA: <1 μg
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μl

2. 65°C保温 5 min 后, 冰上迅速冷却。*3

3. 按下表配制 20 μ l 反应液:

试剂	使用量
上述变性后反应液	10 μ l
5X PrimeScript Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0.5 μ l (20 U)
PrimeScript RTase (200 U/ μ l)	1 μ l (200 U)
RNase Free dH ₂ O	up to 20 μ l

4. 缓慢混匀。

5. 按下列条件进行反转录反应:

30°C 10 min (使用 Random 6 mers 时)

42°C (50°C) *4 30–60 min

6. 95°C保温 5 min*5 使酶失活, 冰上放置。

*1: 为获得良好的实验结果, 2 kb 以上的长片段 cDNA 合成时, Random 6 mers 的使用量为 0.4 μ l (20 pmol), Real Time PCR 反应时, Random 6 mers 的使用量为 2 μ l (100 pmol)。也可以使用 Gene Specific Primer, 此时引物终浓度为 0.1 μ M。

*2: Real Time RT-PCR 反应时, Total RNA 的使用量不超过 1 μ g。

*3: 模板 RNA 的变性步骤对于提高反转录效率很重要。

*4: 通常情况下在 42°C 进行反转录反应。但当反转录引物使用 PCR 的下游引物时, 为了减少由于引物错配等引起的非特异性扩增, 将反转录温度设为 50°C。

*5: 长片段 cDNA 扩增时, 为了保证 1st strand cDNA 的完整性, 请进行 70°C、15 min.失活处理。

● RT-PCR 及 Real Time RT-PCR 反应

1st Strand cDNA 合成反应液无需纯化, 可以直接作为 PCR、Real Time PCR 反应的模板。但是 1st Strand cDNA 合成反应液的添加量不要超过 PCR 反应体系的 1/10。模板量会影响酶的扩增效率。因此需参照 PCR 酶的操作方法选择合适的模板量。

若 PCR 扩增后有非特异性条带或者没有扩增产物, 将 cDNA 合成反应液用 RNase H 处理可改善 PCR 扩增结果。

1. 推荐使用的 PCR 酶。

高扩增效率: *TaKaRa Ex Taq*[®] (Code No. RR001A/B)

TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (Code No. RR006A/B)

长链 DNA 扩增: *TaKaRa LA Taq*[®] (Code No. RR002A/B)

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

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

高保真 PCR 扩增: PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Code No. R010A/B),

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

PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Code No. R045A)

2. Real Time PCR 相关试剂。

嵌合法检测试剂: TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A/B)

TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A/B)

探针法检测试剂: *Premix Ex Taq* (Probe qPCR) (Code No. RR390A/B)

Probe qPCR Mix (Code No. RR391A/B)

● 注意事项

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) 干热灭菌 (180°C, 60 min)。
- (2) 用 0.1% DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液在 37°C 下处理 12 小时。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，使用的灭菌水须用 0.1% 的 DEPC 处理后进行高温高压灭菌。

RNA 实验用的试剂和灭菌水都应专用，避免混用后交叉污染。

【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。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™ RT-PCR Kit (Code No. RR014A/B)

PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Code No. RR055A/B)

TaKaRa Ex Taq® (Code No. RR001A/B)

TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (Code No. RR006A/B)

TaKaRa LA Taq® (Code No. RR002A/B)

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

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Code No. R010A/B)

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Code No. R045A)

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

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A/B)

TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A/B)

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

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

Probe qPCR Mix (Code No. RR391A/B)

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

PrimeScript, Thermal Cycler Dice, *Premix Ex Taq* , 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>

v202204Da