

Code No. 6210A

研究用

TaKaRa

PrimeScript™ II 1st Strand
cDNA Synthesis Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 1st-strand cDNA 合成反应	2
● RT-PCR 反应	2
● RNA 样品的制备	3
● 相关产品	3

● 制品说明

本制品是使用 PrimeScript II RTase 从 Total RNA 或 Poly (A)⁺ RNA 合成 1st Strand cDNA 的试剂盒。含有 1st Strand cDNA 合成所需的全部试剂。

以结构复杂的 RNA 或长链 RNA 为模板进行 cDNA 合成时，cDNA 合成受到抑制的主要原因是 RNA 高级结构与反转录酶的非特异性结合。并且，由于反转录酶的错配引起的非特异性延伸，对 RT-PCR 或全长 cDNA 的合成非常不利。PrimeScript II RTase 是对 PrimeScript RTase 进行进一步改良的反转录酶，本反转录酶可以很好地抑制 RNA 高级结构与反转录酶的非特异性结合。

本制品使用了 PrimeScript II RTase，利用 Oligo dT 从 PolyA 开始进行延伸反应，使用标准反转录温度 42°C，不仅能维持 PrimeScript RTase 原有的卓越的 cDNA 合成效率和 cDNA 合成速度，同时可以合成本底低、纯度高、完整性好的 cDNA。另外，反转录反应液配制时所产生的非特异性延伸是抑制 cDNA 合成的主要原因，本制品能有效控制这一现象。反应液配制后，冰上放置直至反转录反应开始，不会发生抑制 cDNA 合成的现象。

合成的 1st Strand cDNA 可广泛应用于 2nd Strand cDNA 合成、杂交、PCR 法扩增等。特别适用于全长 cDNA 文库制作、高纯度全长 cDNA 合成等。

● 制品内容 (50 次量)

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

【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 特别开发的 dT 区域的序列*

* 该序列与 TaKaRa RNA PCR™ Kit (AMV) Ver. 3.0 (Code No. RR019A)中的 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】

1. 水浴锅
可用 DNA 扩增仪代替。
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)，等。
2. 电泳用凝胶
Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A)，等。
3. 电泳仪
4. 微量离心机
5. 微量移液器和枪头 (高压灭菌)

● 保存: -20℃。

● 1st-Strand cDNA 合成反应

1. 在 Microtube 中配制下列反应混合液。

试剂	使用量
Oligo dT Primer (50 μM) or Random 6 mers (50 μM)	1 μl 1 μl (0.4~2 μl)*1
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
模板 RNA	Total RNA: 5 μg 以下 Poly(A) ⁺ RNA: 1 μg 以下
RNase Free dH ₂ O	Up to 10 μl

2. 65℃保温 5 min 后, 冰上迅速冷却。

(注: 上述处理可使模板 RNA 变性, 提高反转录效率。)

3. 在上述 Microtube 管中配制下列反转录反应液, 总量为 20 μl。

试剂	使用量
上述变性后反应液(from step 2)	10 μl
5×PrimeScript II Buffer	4 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.5 μl (20 U)
PrimeScript II RTase (200 U/μl)	1 μl (200 U)
RNase Free dH ₂ O	Up to 20 μl

4. 缓慢混匀。

5. 按下列条件进行反转录反应:

(30℃ 10 min) (使用 Random 6 mers 时)

42℃ (~50℃)*2 30~60 min

6. 95℃ 5 min*3 (酶失活)后, 冰上冷却。

*1: 2 kb 以下的 cDNA 合成时, Random 6 mers 的使用量为 1~2 μl; 2 kb 以上的 cDNA 合成时, Random 6 mers 的使用量为 0.4~1 μl。也可使用 Gene Specific Primer, 此时, 其在反应体系中的终浓度为 0.1 μM。

*2: PrimeScript II 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℃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。此时可将反转录温度升到 45~50℃, 可能会减少非特异性扩增。

*3: 进行长片段 cDNA 扩增时, 为了避免 1st cDNA 链的破损, 请进行 70℃、15 min 的失活反应。

● RT-PCR 反应

1st Strand cDNA 合成反应液, 可直接作为 PCR 反应的模板使用, 其加入量为 PCR 反应液量的 1/10 以下。模板加入量会对 PCR 的扩增效率有影响, 建议参照 PCR 酶的说明书, 进行适宜模板量的研讨。

在 RT-PCR 反应中, 产生非特异性扩增或无扩增产物时, 将 cDNA 合成反应液用 RNase H 处理可改善 PCR 扩增结果。

【推荐使用的 PCR 酶】

高扩增效率:	<i>TaKaRa Ex Taq</i> [®] 、 <i>TaKaRa Ex Taq</i> HS
长链DNA扩增:	<i>TaKaRa LA Taq</i> [®] 、 <i>TaKaRa LA Taq</i> Hot Start Version PrimeSTAR [®] GXL DNA Polymerase
高保真PCR扩增:	PrimeSTAR Max DNA Polymerase、PrimeSTAR [®] GXL DNA Polymerase PrimeSTAR [®] HS DNA Polymerase

● RNA 样品制备

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(1)或者(2)方法进行处理。

(1)干热灭菌 (180℃, 60 min)

(2)用 0.1% DEPC (焦碳酸二乙酯)水溶液在 37℃下处理 12 小时。然后在 120℃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，需使用干热灭菌 (180℃, 60 min)或用上述方法进行 DEPC 水处理灭菌后的玻璃容器盛装，使用的灭菌水需用 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】

建议使用 GTC 法 (异硫氰酸胍法)制备的高纯度 RNA。RNA 提取试剂盒如 RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)也可以用于分离高纯度 RNA。纯化的 RNA 样本应溶解于灭菌水或 TE buffer 中。

● 相关产品

【相关试剂盒】

高效率、高灵敏度、长链扩增的 2 Step RT-PCR 试剂盒:

PrimeScript[®] RT-PCR Kit (Code No. RR014A/B)

高灵敏度的长链 One Step RT-PCR 试剂盒:

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

【相关 PCR 酶】

高效的 PCR 酶:

TaKaRa Ex Taq[®] (Code No. RR001A/B)

TaKaRa Ex Taq[®] HS (Code No. RR006A/B)

长链 DNA 扩增酶:

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)

高保真酶:

PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (Code No. R045A/B)

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

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

PrimeSTAR, *TaKaRa Ex Taq*, and *TaKaRa LA Taq* are registered trademarks of Takara Bio Inc. PrimeScript, Thermal Cycler Dice, 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。

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: <http://www.takarabiomed.com.cn>