

Code No. RR012A

研究用

---

**TaKaRa**

TaKaRa RNA LA PCR™ Kit  
(AMV) Ver.1.1

---

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 LA PCR 原理	3
● 试剂盒特点	4
● RNA 制备	4
● 使用注意	4
● 实验操作	5
● PCR 反应条件	7
● 实验例	7
● 参考文献	9
● 关联产品	9

## ● 制品说明

TaKaRa RNA LA PCR Kit (AMV) Ver.1.1使用*TaKaRa LA Taq*酶, 实现反转录后的更长更准确的PCR反应。*TaKaRa LA Taq*酶是Takara Bio公司研制的LA (long and accurate) PCR反应的关键组成。本试剂盒利用LA Technology的优势特点, 用AMV (Avian Myeloblastosis Virus) 来源的反转录酶, 由RNA反转录至cDNA, 然后再在同一反应管中用*TaKaRa LA Taq*扩增此cDNA, 操作简单, 使用方便。本试剂盒中的Oligo dT-Adaptor Primer的特别设计, 使从Poly A<sup>+</sup> RNA 3' 端合成cDNA的效率更高, 从而可以利用3' -RACE法高效扩增RNA的3' 端未知区域。

## ● 制品内容 (100 次量\*1)

1. AMV Reverse Transcriptase XL (5 U/ μl) (来源于 Avian Myeloblastosis Virus)	50 μl
2. RNase Inhibitor*2 (40 U/ μl)	25 μl
3. Random 9 mers*2 (50 pmol/ μl)	50 μl
4. Oligo dT-Adaptor Primer (2.5 pmol/ μl)	50 μl
5. RNase Free dH <sub>2</sub> O	1 ml
6. <i>TaKaRa LA Taq</i> (5 U/ μl)	25 μl
7. M13 Primer M4*2 (20 pmol/ μl)	50 μl
8. 10X RNA PCR Buffer 100 mM Tris - HCl (pH8.3) 500 mM KCl	120 μl
9. 10X LA PCR Buffer II (Mg <sup>2+</sup> Free)	500 μl
10. dNTP Mixture (各 10 mM)	150 μl
11. MgCl <sub>2</sub> (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 <sup>5</sup> copies/ μl) (Transcribed poly(A) <sup>+</sup> RNA of pSPTet3 plasmid)	25 μl

\* 1: 本试剂盒可用于 100 次反应 (总反应量: RT 反应 10 μl, PCR 反应 50 μl)

\* 2: 【各种引物序列】

引物名称	各引物序列
Random 9 mers	5' -NNNNNNNNNN-3'
Oligo dT-Adaptor Primer	包含 dT 区域及 M13 Primer M4 序列。
Control F-1 Primer	5' -CTGCTCGCTTCGCTACTTGG-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)<sup>+</sup> 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。

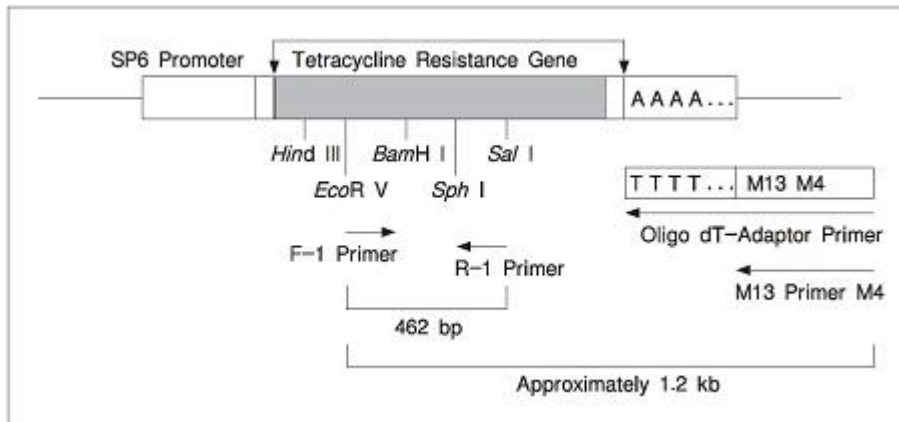


图 1. Positive Control RNA: 使用各种引物所能扩增的 DNA 片段

## ● Kit 外所需材料

### 1、试剂

琼脂糖凝胶

如 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)

琼脂糖凝胶电泳装置

如 Mupid-2plus (Code No. M-2P)

Mupid-exU (Code No. EXU-1)

Mupid-One (Code No. O1-01 )

Microcentrifuge

移液器和枪头 (高压灭菌)

## ● 保 存: -20℃

## ● RNA LA PCR 原理

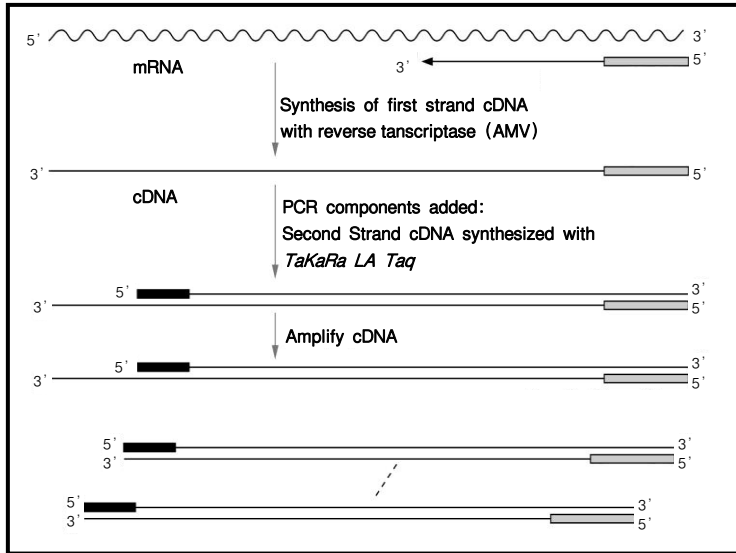
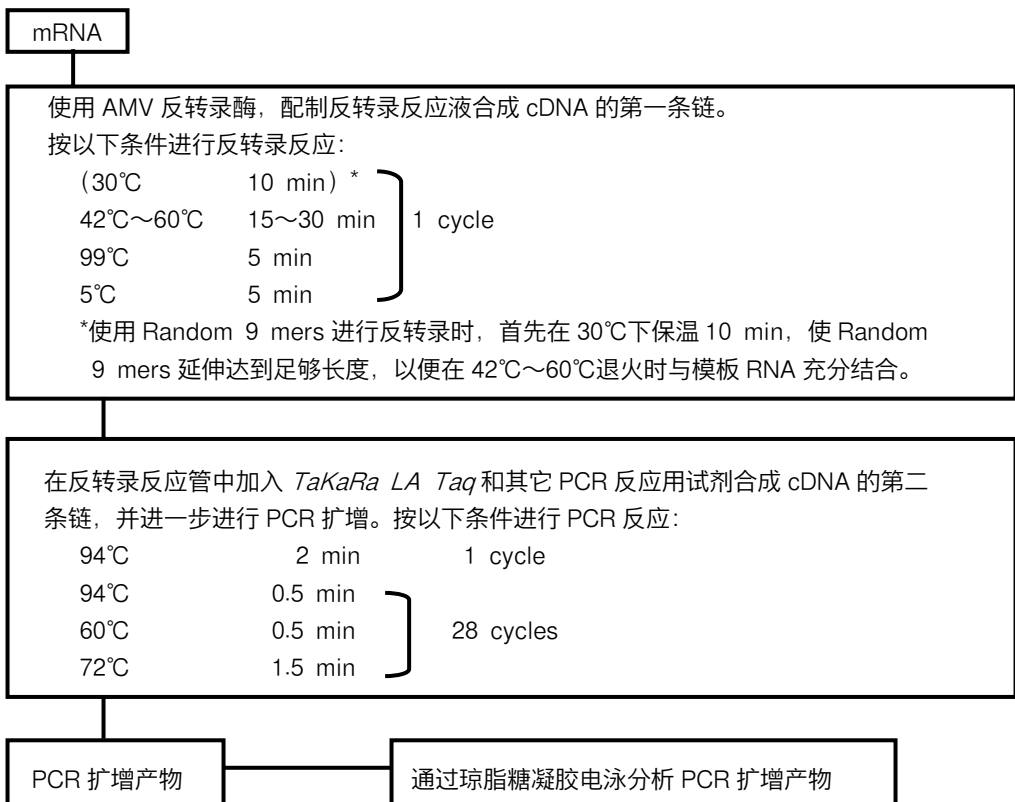


图 2. RNA LA PCR 原理



本试剂盒使用 AMV 来源的反转录酶由 RNA 合成 cDNA，并可在同一反应管中使用 *TaKaRa LA Taq* 酶扩增此 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	~12 kb
反转录酶	AMV Reverse Transcriptase (反转录反应温度在 42°C~60°C)
DNA 聚合酶	<i>TaKaRa LA Taq</i>
RNase Inhibitor	试剂盒中含有
合成 cDNA 第一条链的引物	Random 9 mers 或 Oligo dT-Adaptor Primer 或 特异性下游 PCR Primer } 可供选择
3' -RACE 法	RT 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 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】

市售的无菌一次性塑料设备可被视为不含 RNase, 可直接用于实验中。microtube 和移液器枪头等设备应在使用前进行高压灭菌。玻璃器皿和刮刀在 160°C 下进行干热灭菌至少 2 个小时。不能通过干热灭菌的物品应在 37°C 下用 0.1% 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 溶液处理 12 小时, 然后高温高压灭菌 (以防止 DEPC 引起 RNA 的羧甲基化)。

用于 RNA 实验的设备应与其他设备分开。另外, 由于最常见的 RNase 污染源是双手, 因此在进行 RNA 实验时应戴上手套和口罩。

### 【试剂配制】

使用前, 试剂尽可能用 0.1% DEPC 处理并高压灭菌。对于不能进行高压灭菌的试剂, 请使用已灭菌的设备和水进行制备, 然后在制备后进行过滤除菌。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

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) 当同时需要进行多个反转录反应或 PCR 反应时, 应先配制各种试剂的混合液 (其中包括 RNase Free dH<sub>2</sub>O、Buffer、dNTP Mixture、MgCl<sub>2</sub> 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 (AMV)、RNase Inhibitor、*TaKaRa LA Taq* 等试剂时，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) 酶制品应在实验前才从-20℃中取出，使用后也应立即放回-20℃中保存。
- 4) 分装试剂时务必使用新的枪头，以防止样品间污染。
- 5) PCR 反应条件  
最适的 PCR 条件因 PCR 扩增仪的不同而不同，建议在进行样品实验前最好先试做一下 Control 实验。
- 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，使用任何一对特异性引物都能获得良好的扩增。
Oligo dT Primer	适用于具有 Poly A <sup>+</sup> 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 <sup>+</sup> 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

### A. 反转录反应

- ① 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。按下列组成配制反转录反应液。

试剂	使用量	终浓度
MgCl <sub>2</sub>	2 μl	5 mM
10X RNA PCR Buffer	1 μl	1X
RNase Free dH <sub>2</sub> O	4.25 μl	
dNTP Mixture	1 μl	1 mM
RNase Inhibitor	0.25 μl	1 U/μl
AMV Reverse Transcriptase XL <sup>*1</sup>	0.5 μl	0.25 U/μl
Random 9 mers 或 Oligo dT-Adaptor Primer 或特异性下游 PCR primer( R-1 Primer)	0.5 μl	2.5 μM 或 0.125 μM 或 1.0 μM
Positive Control RNA 或实验样品 RNA	0.5 μl	[1 × 10 <sup>5</sup> copies] 或 [≤ 500 ng total RNA]
Total	10 μl per reaction	

② 按以下条件进行反转录反应。

(30°C	10 min)	*2	}	1 cycle
42°C~60°C	15~30 min	*3		
99°C	5 min	*4		
5°C	5 min			

- \* 1 Reverse Transcriptase 能与 cDNA 结合，直接进行 PCR 反应有阻害作用。在 99°C 下热处理 5 分钟可灭活 RTase，并消除对 PCR 的抑制作用。因此，在使用长链 RNA 进行反转录反应时，不要增加 RTase 的量，可将延伸反应的时间延长。
- \* 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 RTase 可在 60°C 下反应。但当反应温度在小于 60°C 时，建议在 42°C 左右进行反转录。当以阳性对照 RNA 为模板时，建议在 50°C 进行反转录。
- \* 4 长链扩增时，建议 70°C 下 15 min 失活，保证 1st strand cDNA 的完整性。

## B. PCR 反应

① 按下列组成配制 PCR 反应液。

试剂	使用量	终浓度 (50 μl 反应液)
MgCl <sub>2</sub>	3 μl	2.5 mM
10X LA PCR Buffer II (Mg <sup>2+</sup> Free)	4 μl	1X
灭菌水	31.75 μl	
<i>TaKaRa LA Taq</i>	0.25 μl	1.25 U/50 μl
上游 PCR Primer (使用 Control RNA 时，请使用 F-1 Primer)	0.5 μl	0.2 μM
下游 PCR Primer*1 (使用 Control RNA，并在反转录时使用 Oligo dT-Adaptor Primer 时，请使用 R-1 Primer 或者 M13 Primer M4)	0.5 μl	0.2 μM
Total	40 μl per reaction	

\* 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。如有可能，下游特异性 PCR 用引物不要使用反转录引物，这样能提高 PCR 扩增效率。

② 把 40 μl 的 B-① 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。

94°C	2 min	1 cycle	}	28 cycles
94°C	30 sec			
60°C	30 sec			
72°C	1-2 min/kb			

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\*2。

\* 2: 如果此 PCR 产物用于后续实验，须将 PCR 产物冷冻保存。



## ● PCR 反应条件

### ■ 退火温度

可根据实际情况适当地提高或降低退火温度(37°C~65°C)。

### ■ 延伸时间

通常 *TaKaRa LA Taq* 在 72°C 时, 每 kb 延伸时间为 1~2 min。

### ■ 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。

## ● 实验例

(1) mRNA 样品的 RT-PCR 实验例 (约 12 kb)

■ 样品 RNA: 人心脏来源 poly A<sup>+</sup> RNA。

■ Target gene: Human dystrophin。

■ 扩增片段大小: 12 kb。

### A. 反转录反应

① 按下列组成配制反应液。

试剂	使用量	终浓度
MgCl <sub>2</sub>	2 μl	5 mM
10X RNA PCR Buffer	1 μl	1X
RNase Free dH <sub>2</sub> O	4.5 μl	
dNTP Mixture	0.25 μl	1 mM
RNase Inhibitor	0.5 μl	1 unit/μl
Reverse Transcriptase	0.5 μl	0.25 U/μl
Random 9 mers	0.5 μl	2.5 μM
total human heart poly A <sup>+</sup> RNA	0.25 μl	0.25 μg/10 μl RT
Total	10 μl per reaction	

② 按以下条件进行反转录反应。

30°C	10 min	} 1 cycle
42°C	50 min	
70°C	15 min *1	

\*1 Reverse Transcriptase 能与 cDNA 结合, 直接进行 PCR 反应有阻害作用。因此, PCR 反应前, 必须进行 70°C、15 分钟加热使 Reverse Transcriptase 失活。在此不进行 99°C、5 分钟的反转录酶失活处理, 因高温处理会使合成的单链 cDNA 断裂, 影响长片段 PCR 扩增。

### B. PCR 反应

按下列组成配制 PCR 反应液。

试剂	使用量	终浓度 (50 μl 反应液)
MgCl <sub>2</sub>	3 μl	2.5 mM
10X LA PCR Buffer II (Mg <sup>2+</sup> Free)	4 μl	1X
灭菌水	31.75 μl	
<i>TaKaRa LA Taq</i>	0.25 μl	1.25 U/50 μl
Primers	each 0.5 μl	each 0.2 μM
Total	40 μl per reaction	

- ② 把 40  $\mu$ l 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 按以下条件进行 PCR 反应。
- |      |        |             |
|------|--------|-------------|
| 94°C | 30 sec | } 30 cycles |
| 65°C | 15 min |             |
- ④ 反应结束后，取 PCR 反应液 5  $\mu$ l 进行琼脂糖凝胶电泳，确认得到了 12 kb 的目的扩增产物。

(2) 3' -RACE 法实验例

- 样品 RNA: Human HL60 Total RNA
- Target gene: Transferrin receptor (TFR)
- 扩增 DNA 片段大小: 1105 bp

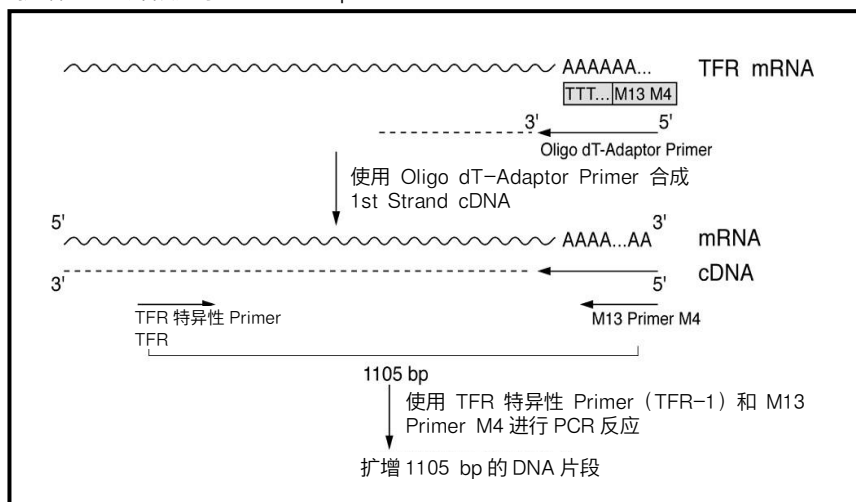


图 3. 对 HL60 Total RNA 使用 3' -RACE 法进行 RT-PCR 反应流程

**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	终浓度
MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ l	5 mM
10X RNA PCR Buffer	1 $\mu$ l	1X
RNase Free dH <sub>2</sub> O	4.25 $\mu$ l	
dNTP Mixture	1 $\mu$ l	1 mM
RNase Inhibitor	0.25 $\mu$ l	1 U/ $\mu$ l
Reverse Transcriptase	0.5 $\mu$ l	0.25 U/ $\mu$ l
Oligo dT-Adaptor Primer	0.5 $\mu$ l	0.125 $\mu$ M
HL60 total RNA(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ g/10 $\mu$ l RT
Total	10 $\mu$ l per reaction	

- ② 按以下条件进行反转录反应。

30°C	10 min	} 1 Cycle
50°C	30 min	
99°C	5 min	
5°C	5 min	

## B. PCR 反应

① 按以下组成配制 PCR 反应液。

试剂	使用量	终浓度(50 $\mu$ l 反应液)
MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ l	2.5 mM
10X LA PCR Buffer II (Mg <sup>2+</sup> Free)	4 $\mu$ l	1X
灭菌水	31.75 $\mu$ l	
<i>TaKaRa LA Taq</i>	0.25 $\mu$ l	1.25 U/50 $\mu$ l
M13 Primer M4	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
TFR-1 Primer	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
Total	40 $\mu$ l per reaction	

② 把 40  $\mu$ l 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 按以下条件进行 PCR 反应。

94°C	30 sec	} 30 cycles
55°C	30 sec	
72°C	5 min	

④ 反应结束后，取 5  $\mu$ l 的 PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳，确认得到了 1,105 bp 的目的扩增产物。

## ● 参考文献

- 1) Kawasaki E S and Wang A M. *PCR Technology* (Erich, 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 Sc. USA*. (1988) **85**: 8998 – 9002.

## ● 关联产品

AMV Reverse Transcriptase XL for RT-PCR (Code No. 2630A)  
Recombinant RNase Inhibitor (Code No. 2313A/B)  
Ribonuclease Inhibitor (Porcine liver) (Code No. 2311A/B)  
*TaKaRa LA Taq*<sup>®</sup> (Code No. RR002A/B)  
Random Primer (nonadeoxyribonucleotide mixture; pd(N)<sub>9</sub>) (Code No. 3802)  
*TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice*<sup>™</sup> Gradient (Code No. TP600)  
*TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice*<sup>™</sup> *Touch* (Code No. TP350)  
Mupid-2plus (Code No. M-2P)  
Mupid-exU (Code No. EXU-1)  
Mupid-One (Code No. O1-01)  
PrimeGel<sup>™</sup> Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A)  
PrimeGel<sup>™</sup> Agarose LE 1–20K GAT (Code No. 5801A)  
NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250)

*Takara LA Taq* is a registered trademark of Takara Bio Inc.

LA PCR, PrimeGel, and Thermal Cycler Dice 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