

Code No. RR023A

研究用

Takara

*Bca*BEST™ RNA PCR Kit Ver.1.1

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 试剂盒外所需实验材料	2
● 保 存	2
● 试剂盒原理	2
● 特 点	3
● RNA 样品制备	3
● 操作注意事项	4
● 操作方法	5
● 参考文献	6
● 关联产品	7

● 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。

本试剂盒含有从 RNA 反转录到 cDNA 以及扩增此 cDNA 所必需的全部试剂, 即用 *Bacillus caldotenax* 来源的 *Bca*BEST Polymerase 从 RNA 合成 cDNA, 然后在同一试管内加入应用 LA PCR 技术研制的 *Bca*-Optimized Taq 扩增此 cDNA。此外, 使用 *Bca*BEST Polymerase 进行反转录反应的最适温度是 65°C, 所以对具有复杂二级结构的 RNA 特别适合。

● 制品内容 (100 次量) *1

1. <i>Bca</i> BEST Polymerase (22 units/μl)	50 μl
2. RNase Inhibitor (40 units/μl)	25 μl
3. Random 9 mers (50 μM)	50 μl
4. Oligo dT Primer (50 μM)	50 μl
5. RNase Free dH ₂ O	1 ml
6. <i>Bca</i> -Optimized Taq (5 units/μl)	25 μl
7. 2X <i>Bca</i> 1st Buffer	1.25 ml × 2
8. 5X <i>Bca</i> 2nd Buffer	800 μl
9. dNTP Mixture (ea. 10 mM)	50 μl
10. MgSO ₄ (25 mM)	500 μl
11. Control F-1 primer *2 (20 μM) (upstream sense primer for Positive Control RNA)	25 μl
12. Control R-1 primer *3 (20 μM) (downstream antisense primer for Positive Control RNA)	25 μl
13. Positive Control RNA (2 × 10 ⁵ copies/μl)	25 μl

*1: 反转录反应 10 μl, PCR 反应体系 50 μl, 可使用 100 次。

*2: Positive Control RNA 用上游引物。

*3: Positive Control RNA 用下游引物。

【各引物信息】

引物名称	各引物序列
Random 9 mers	5' -NNNNNNNNN-3'
Oligo dT Primer	包含 Takara 特别设计的 dT 区域。本序列与 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (Code No. RR019A/B) 及 TaKaRa RNA LA PCR Kit (AMV) Ver.1.1 (Code No. RR012A) 中的 Oligo dT-Adaptor Primer 的序列不同, 没有 M13 Primer M4 区域。
Control F-1 Primer	5' -CTGCTCGCTTCGCTACTTGGA-3'
Control R-1 Primer	5' -CGGCACCTGTCTACGAGTTG-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。Control RNA 简图见图 1。

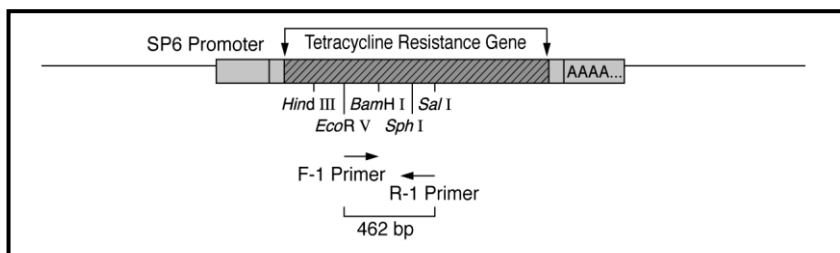


图 1. Positive Control RNA: Control 反应扩增的 DNA 片段

● 试剂盒外所需实验材料

- 琼脂糖凝胶电泳装置
 - Agarose L03 (Code No. 5003/5003B)
 - PrimeGel™ Agarose LE 1–20K GAT (Code No. 5801A)
 - PrimeGel Agarose PCR–Sieve (Code No. 5810A)
- PCR 仪器
 - TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
 - TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Gradient* (Code No. TP600)
- 微型离心机
- 微量移液器及枪头 (autoclaved)

● 保 存: -20°C

● 试剂盒原理

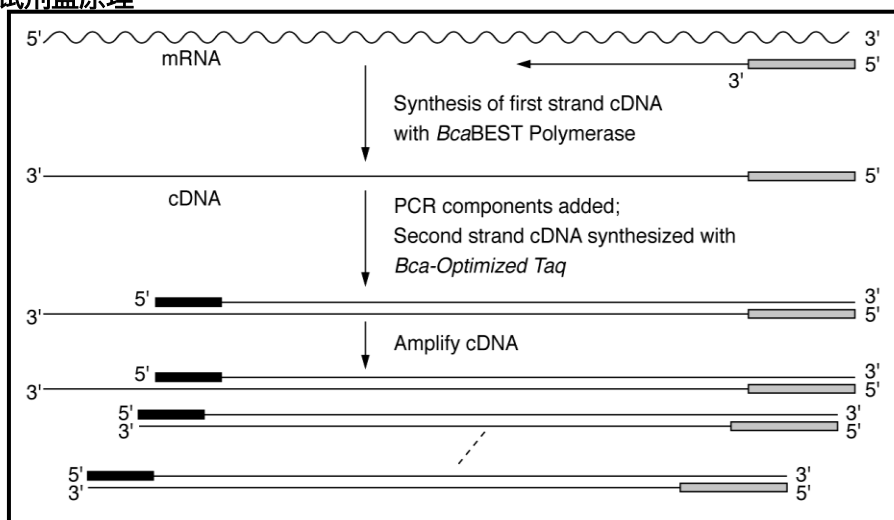


图 2. BcaBEST RNA PCR 的原理图

本制品使用 *BcaBEST Polymerase* 从 RNA 合成 cDNA, 然后在同一试管内加入 *Bca-Optimized Taq* 扩增此 cDNA。

Random 9 mers、Oligo dT Primer 或特异性下游引物都可以作为 PCR 反应的反义引物进行 cDNA 的合成。

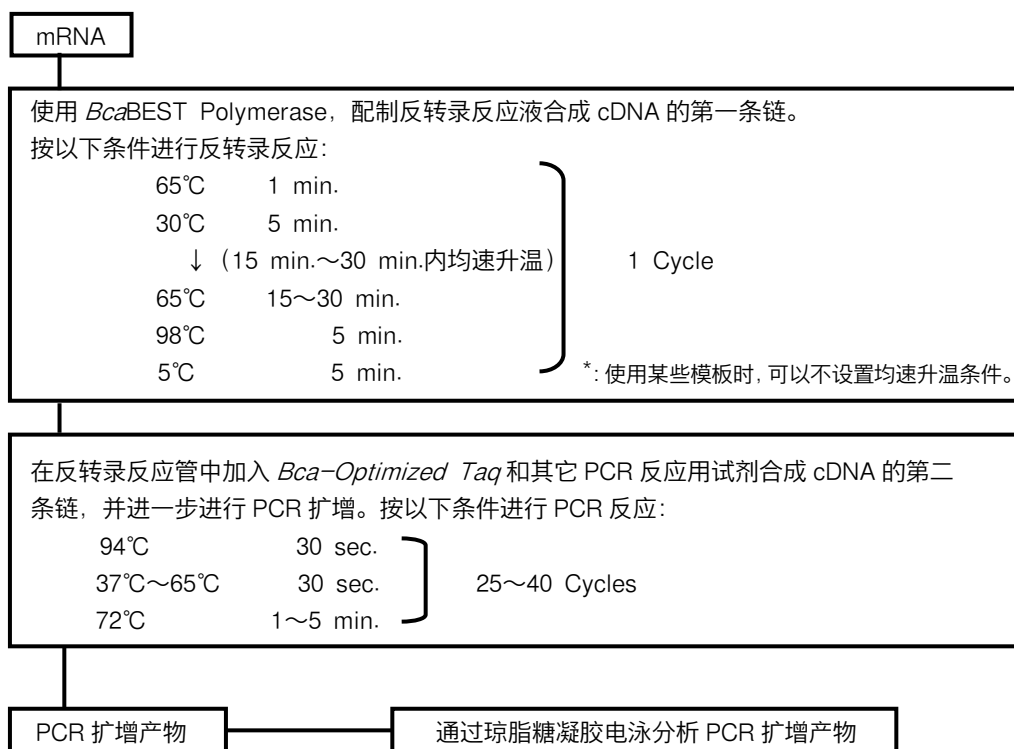


图 3. *BcaBEST* RNA PCR 流程图

● 特 点

RNA模板	适用于所有 RNA (对富含 GC 的 mRNA 及具有复杂二级结构的 mRNA 特别有效)
扩增片段大小	5 kb以下
反转录酶	<i>BcaBEST</i> Polymerase (最适温度 65°C)
DNA聚合酶	<i>Bca-Optimized Taq</i>
RNase Inhibitor	必须使用 (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
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℃，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（只需少量的 RNA 便可进行 RT-PCR 反应）。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。

使用 NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10) 或 RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)，可从组织、细胞中快速提取高纯度的 Total RNA。

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。

● 操作注意事项

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、MgSO₄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*BcaBEST* Polymerase、RNase Inhibitor、*Bca-Optimized Taq*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. 为了防止Positive Control RNA分解，应尽量避免反复冻融。有条件的实验室最好保存于 -70℃~-80℃。
5. 分装试剂时务必使用新的枪头（Tip），以防止样品间污染。

【引物的选择】

用于反转录的引物可视实验具体情况选择Random 9 mers、Oligo dT 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。

Oligo dT Primer:

适用于具有Poly(A)⁺ Tail的RNA。本Primer设计巧妙，反转录效率高。（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)⁺）。

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。

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。

● 操作方法

一般RT-PCR反应

A. 反转录反应

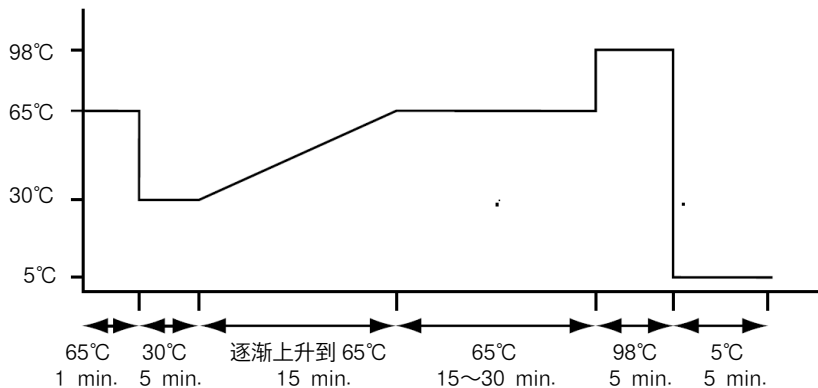
1. 按下列组成配制反转录反应液。

试剂	使用量	终浓度	
2X <i>Bca</i> 1st Buffer	5 μ l	1X	
25 mM MgSO ₄	2 μ l	5 mM	
dNTP Mixture (各10 mM)	0.5 μ l	0.5 mM	
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0.25 μ l	1 U/ μ l	
<i>Bca</i> BEST Polymerase (22 U/ μ l)	0.5 μ l	1.1 U/ μ l	
Random 9 mers 或Oligo dT Primer 或特异性下游PCR引物	0.5 μ l		
Positive Control RNA 或实验样品RNA *1			0.5 μ l
RNase Free dH ₂ O	0.75 μ l		
10 μ l/Sample			

*1: 当使用低拷贝数实验样品RNA时, 体积可增至1.25 μ l。

2. 将反应管放在PCR仪内, 按照如下反应程序开始反应。

【Positive Control RNA作为模板时】



B. PCR反应

1. 按下列组成配制PCR反应液 (常规方法)。

试剂	使用量	终浓度 (50 μ l体系)
25 mM MgSO ₄	3 μ l	2.5 mM
5X <i>Bca</i> 2nd Buffer	8 μ l	1X
<i>Bca</i> -Optimized <i>Taq</i>	0.25 μ l	1.25 U/50 μ l
上游Primer*5 (Sense)	0.5 μ l	0.2 μ M
下游Primer*6 (Antisense)	0.5 μ l	0.2 μ M
灭菌水	27.75 μ l	
40 μ l/Sample		

*5: Positive Control RNA用上游引物F-1 Primer。

*6: Positive Control RNA用下游引物R-1 Primer。如果反转录反应中使用了下游PCR引物, 那么此处下游引物由0.5 μ l灭菌水替代。

*变更方法

按上述反应组成进行PCR反应，得不到扩增产物时，请再试用以下反应组成，有时结果会得到改善。

试剂	使用量	终浓度
25 mM MgSO ₄	3 μl	2.5 mM
2X <i>Bca</i> 1st Buffer	20 μl	1X
<i>Bca-Optimized Taq</i>	0.25 μl	1.25 U/50 μl
上游Primer* ⁵ (Sense) * ⁵	0.5 μl	0.2 μM
下游Primer* ⁶ (Antisense) * ⁶	0.5 μl	0.2 μM
灭菌水	15.75 μl	
40 μl/Sample		

2. 把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. 使用微型离心机离心约10秒钟。
4. 按以下条件进行PCR反应。

一般反应条件

94°C	30 sec.	} 25~30 Cycles
37°C~65°C	30 sec.	
72°C	1~10 min.	
72°C	5 min.	

Positive Control RNA的反应条件

94°C	30 sec.	} 28 cycles
60°C	30 sec.	
72°C	1 min.	

5. 反应结束后，取一部分反应液 (5~10 μl) 进行电泳检测。如果不立即进行电泳确认，请将反应产物冻结保存。

【Positive Control RNA的扩增结果】

反转录反应Primer	PCR Primers	扩增片段大小
Oligo dT Primer	F-1、R-1	462 bp
Random 9 mers	F-1、R-1	462 bp
R-1 Primer	F-1、R-1	462 bp

PCR条件设定

· 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

延伸时间因目的序列长度的不同而不同。

通常，*Bca-Optimized Taq*在72°C设定延伸时间为1~2 min/1 kb。

· 循环次数

cDNA量较少时，循环次数可增加为30~50 cycles。

● 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

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Gradient* (Code No. TP600)
NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250)
RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)
RNase-OFF® (Code No. 9037)
Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003/5003B)

RNase-OFF is a registered trademark of PureBiotech, LLC.

PrimeGel, *Bca*BEST, LA PCR, *Bca-Optimized*, TaKaRa RNA PCR, 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.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>