

Code No. RR024A

研究用

TaKaRa

TaKaRa One Step RNA PCR
Kit (AMV)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 原 理	1
● 试剂盒特点	1
● 制品内容	2
● Kit 外所需材料	2
● 保 存	3
● 实验操作	3
1、RNA 样品制备	3
2、使用注意	3
3、标准的 RT-PCR 操作	3
● 实验例	4
1、HL60 细胞 total RNA 中 TFR 基因 (1.0, 2.0 和 4.4 kb) cDNA 片段扩增	4
2、PCR 反应条件	5
3、PCR 产物	5
● 参考文献	5
● 关联产品	5

● 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。

本试剂盒采用了一步反应法 (One Step法) 完成RT-PCR反应。RNA→cDNA→PCR反应操作在同一反应体系中进行, 反应中途不需添加任何试剂, 就可以完成由AMV (Avian Myeloblastosis Virus) 由来的反转录酶从RNA反转录为cDNA, 再由AMV-Optimized Taq (根据LA PCR技术研制) 扩增cDNA的全部反应。常规RT-PCR试剂盒采用2 step PCR进行连续反应, 并分别配制反应液, 这些操作增加了污染的可能性, 而本试剂盒将污染可能降到很小, 并且提供的AMV-Optimized Taq可用于LA PCR。本试剂盒中含有进行One Step法RT-PCR反应应用的全部试剂, 可以简便而有效地对RNA进行扩增分析。

● 原理

TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) 可在同一反应管中完成由 AMV 反转录酶从 RNA 反转录为 cDNA, 再使用 AMV-Optimized Taq 扩增此 cDNA 的 RT-PCR 反应。

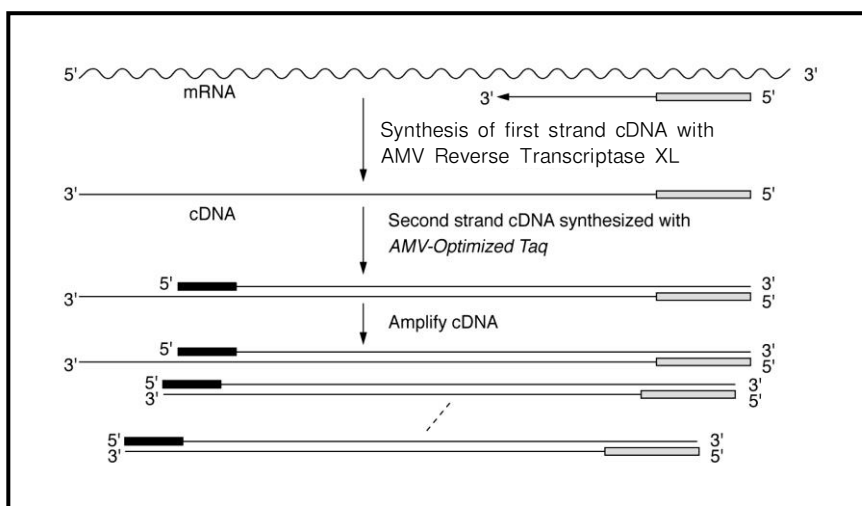


图 1. One Step RT-PCR 原理图

● 试剂盒特点

RNA 模板	适用于所有 RNA
扩增片段大小	~5.6 kb
反转录酶	AMV Reverse Transcriptase XL (反转录反应温度在 42°C~60°C)
反转录引物	特异性下游引物(PCR 扩增反应用反义链引物) (不可以使用 Oligo dT primer 和 Random primer)
DNA 聚合酶	AMV-Optimized Taq
RNase Inhibitor	Kit 中含有
操作	在同一反应管中连续进行 (PCR 反应前加热使 RTase 失活)

● 制品内容 (50 次量)

1. AMV Reverse Transcriptase XL (5 U/ μ l)	50 μ l
2. RNase Free dH ₂ O	1 ml \times 2 支
3. RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	50 μ l
4. <i>AMV-Optimized Taq</i> (5 U/ μ l)	50 μ l
5. 10X One Step RNA PCR Buffer	250 μ l
6. dNTP Mixture (各 10 mM)	250 μ l
7. MgCl ₂ (25 mM)	500 μ l
8. Control F-1 Primer (20 μ M) * ¹ (Positive Control RNA 用上游引物)	25 μ l
9. Control R-1 Primer (20 μ M) * ¹ (Positive Control RNA 用下游引物)	25 μ l
10. Positive Control RNA * ² (2×10^5 copies/ μ l) (polyA ⁺ RNA transcribed from pSPTet3 plasmid)	25 μ l

*1: 各种引物序列

引物名称	各引物序列
Control F-1 Primer	5' -CTGCTCGCTTCGCTACTTGGA-3'
Control R-1 Primer	5' -CGGCACCTGTCCTACGAGTTG-3'

*2: 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。

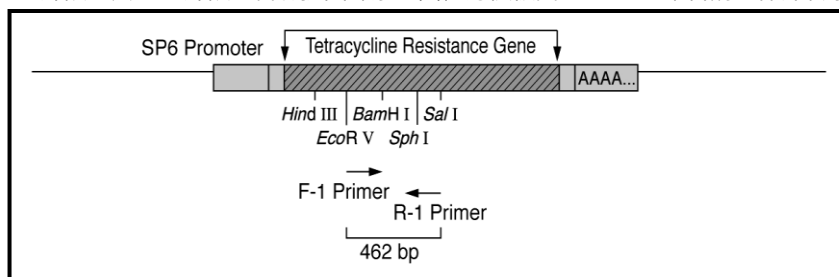


图 2. Positive Control RNA: 进行 Control 实验时所能扩增的 DNA 片段

● Kit 外所需材料

- 琼脂糖凝胶
如 PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A),
PrimeGel Agarose LE 1-20K GAT (Code No. 5801A)
- PCR 仪
- Microcentrifuge tubes (聚丙烯材料)
- 琼脂糖凝胶电泳仪
如 Mupid-exU, Mupid-2plus (Mupid CO.,LTD)
- Microcentrifuge
- 移液器和枪头 (高压灭菌)

● **保存:** -20°C

● **实验操作**

1、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, 包括蒸馏水在内, 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 (也可使用 RNA 实验用的一次性塑料容器), 使用的无菌水须用 0.1% 的 DEPC 处理后进行高温高压灭菌。

RNA 实验用的试剂和无菌水都应专用, 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。

2、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) 当同时需要进行数次 RT-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、MgCl₂ 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 RTase、RNase Inhibitor、AMV-Optimized Taq 酶等酶类时, 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) 酶制品应在实验前从 -20°C 中取出, 使用后也应立即放回 -20°C 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°C ~ -80°C。
- 5) 分装试剂时务必使用新的枪头 (Tip), 以防止样品间污染。
- 6) 使用本试剂盒进行反转录反应时必须使用特异性的反转录引物, Random 9 mers、Oligo dT Primer 不能使用。

3、标准的 RT-PCR 操作

- ① 按下列组成配制 RT-PCR 反应液。

试剂	使用量	终浓度 (或加入体积)
10X One Step RNA PCR Buffer	5 μ l	1X
MgCl ₂ (25 mM)	10 μ l	5 mM
dNTP Mixture (10 mM)	5 μ l	1 mM
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	1 μ l	0.8 units/ μ l
AMV RTase XL (5 U/ μ l)	1 μ l	0.1 units/ μ l
<i>AMV-Optimized Taq</i> (5 U/ μ l)	1 μ l	0.1 units/ μ l
Specific upstream PCR primer (20 μ M) *1	1 μ l	0.4 μ M
Specific downstream PCR primer (20 μ M) *2	1 μ l	0.4 μ M
Positive Control RNA 或 Experimental Sample*3	1 μ l	1 μ g total RNA
RNase Free dH ₂ O	24 μ l	
Total	50 μ l	

*1 : Positive Control RNA 使用 Control F-1 Primer 作为上游引物。

*2 : Positive Control RNA 使用 Control R-1 Primer 作为下游引物。

本试剂盒反转录反应时使用 Specific downstream PCR primer (不能使用 Random primer 或 oligo dT primer)。

*3 : RNA 样品浓度偏低或目的基因表达量少时, 样品体积量可增加到 25 μ l。

② 按以下条件进行 RT-PCR 反应。

[Standard condition]

50°C	30 min	RT 反应
94°C	2 min	RTase 失活
94°C	30 sec	} PCR 25-30 cycles
37-65°C	30 sec	
72°C	1-10 min	

[Positive control RNA]

50°C	15 min	
94°C	2 min	
94°C	30 sec	} 28 cycles
60°C	30 sec	
72°C	1.5 min	

③ 反应结束后, 取 PCR 反应液 (5~10 μ l) 进行琼脂糖凝胶电泳, 确认 RT-PCR 扩增产物。使用 Positive Control RNA 时可以确认到 462 bp 的 PCR 扩增产物。如果此 PCR 产物需用于以后实验, 须将 PCR 产物冷冻保存。

● 实验例

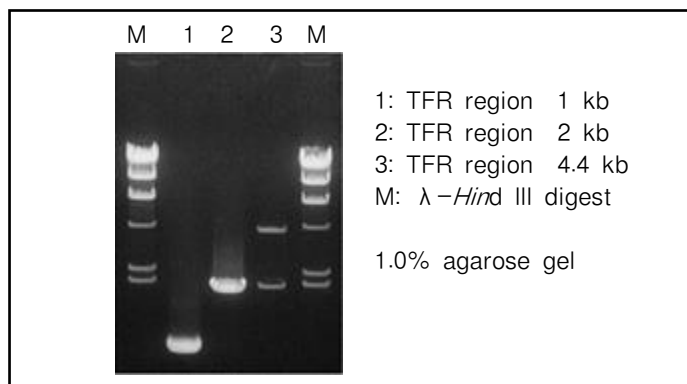
1、HL60 细胞 total RNA 中 TFR 基因 (1.0, 2.0 和 4.4 kb) cDNA 片段扩增

① 按照“实验操作 3”配制反应液。

② 按以下条件进行 RT-PCR 反应。

50°C	30 min	
94°C	2 min	
94°C	30 sec	} 30 cycles
60°C	30 sec	
72°C	6 min	

③ 反应结束后，取 PCR 反应液 4 μ l 进行 1%的琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增产物。



2、PCR 反应条件

■ 退火温度

Control RNA 在 60°C 退火，但退火温度可以根据样品情况不同而改变。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，通常使用 *AMV-Optimized Taq* 时在 72°C 下每 kb 设定时间在 1~2 min.。

■ 循环次数

cDNA 量较少时，循环次数可增加为 40~50 次。

3、PCR 产物

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。可使用 Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End)(Code No. 6027) 实现平滑末端的载体克隆。

● 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., Martin, G. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (1988) **85**: 8998-9002.
- 4) Mallet, F., Oriol, G., Mary, C., Verrier, B., and Mandrand, B. *BioTechniques*. (1995)**18** (4): 678-687.

● 关联产品

Reverse Transcriptase XL (AMV) for RT-PCR (Code No. 2630A)

Recombinant RNase Inhibitor (Code No. 2313A/B)

Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (Code No. TP600)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)

Thermal Cycler Dice and PrimeGel 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