

Code No. RR055A

研究用

TAKARA

PrimeScript™ One Step
RT-PCR Kit Ver.2

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 |
| ● 原 理 | 2 |
| ● 试剂盒特点 | 2 |
| ● 使用注意 | 3 |
| ● 实验操作 | 3 |
| ● PCR 反应条件 | 4 |
| ● 实验例 | 4 |
| ● RNA 样品制备 | 5 |
| ● 关联产品 | 6 |

● 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, RT-PCR 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 (One Step) RT-PCR 法。RNA→cDNA→PCR 反应操作在同一反应体系中连续进行, 反应中途不需添加任何试剂, 降低污染风险。反转录反应使用了 Takara Bio 公司特别开发的新型反转录酶 PrimeScript RTase。该反转录酶对具有复杂二级结构的 RNA 模板也具有很强的延伸能力; PCR 反应使用了扩增性能优越的 Hot Start 型 DNA 聚合酶 *TaKaRa Ex Taq*[®] HS, 大大提高了本试剂盒的扩增性能和反应特异性。在本试剂盒中, 已将 PrimeScript RTase、*TaKaRa Ex Taq* HS、RNase Inhibitor 以及 One Step RT-PCR 用稳定剂等配制成了 Premix 型的 PrimeScript 1 step Enzyme Mix; 同时把反应用 Buffer、dNTP 以及 One Step Enhancer Solution 配制成了 Premix 型的 2X 1 Step Buffer 的形式, 使实验操作时的反应液配制更为简单方便。使用本试剂盒可进行高效的 RT-PCR 扩增。反转录温度可以设定为 50°C, 能够有效抑制非特异性扩增。另外, 本试剂盒可减少由于错配和引物二聚体造成的非特异性反应。

本试剂盒中含有进行 One Step RT-PCR 反应的全部试剂, 可以方便有效地对 RNA 进行扩增分析。

● 制品内容 (50 次量)

| | |
|---|------------|
| 1. PrimeScript 1 Step Enzyme Mix | 100 μl |
| 2. 2X 1 Step Buffer | 625 μl × 2 |
| 3. Control F-1 Primer (20 μM) *1 | 20 μl |
| 4. Control R-1 Primer (20 μM) *2 | 20 μl |
| 5. Positive Control RNA (2 × 10 ⁵ copies/μl) | 20 μl |
| 6. RNase Free dH ₂ O | 625 μl × 2 |

*1 Positive Control RNA 用上游引物。

*2 Positive Control RNA 用下游引物。

【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' |

【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 聚合酶体外转录而得到的。

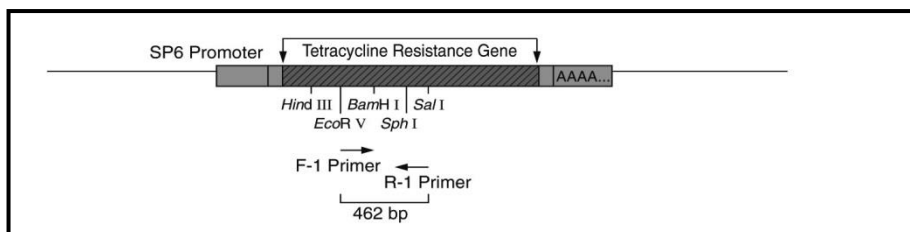


图 1. Positive Control RNA: 使用 Control Primer 可以扩增 462 bp 的 DNA 片段

● Kit 外所需材料

1. PCR 仪 (authorized instruments)
如 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (Code No. TP600) 等。
2. 琼脂糖凝胶
如 Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003/5003B)
PrimeGel™ Agarose PCR–Sieve (Code No. 5810A) 等。
3. 电泳仪
4. Microcentrifuge
5. 移液枪和枪头 (高压灭菌)

● 保存: -20°C。

● 原理

PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 可在同一反应管中连续进行由 PrimeScript RTase 将 RNA 反转录为 cDNA, 再由 *TaKaRa Ex Taq* HS 扩增此 cDNA 的 RT-PCR 反应。

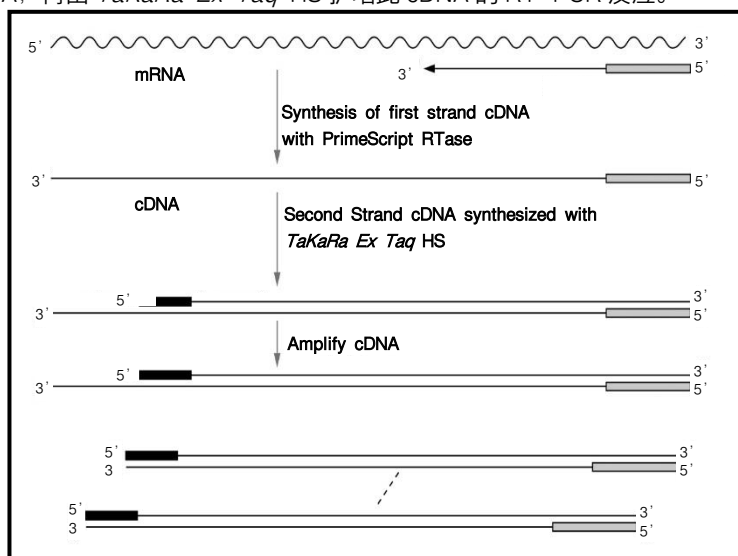


图 2. PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 原理图

● 试剂盒特点

| | |
|-------------------------------|--|
| RNA 模板 | 适用于所有 RNA |
| 扩增片段大小 | ~8 kb |
| PrimeScript 1 Step Enzyme Mix | PrimeScript RTase |
| | DNA Polymerase (<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS) |
| | RNase Inhibitor |
| 2X 1 Step Buffer | 反应 Buffer |
| | dNTP Mixture (终浓度 400 μM) |
| | One Step Enhancer Solution |
| 1st strand cDNA 合成用引物 | 特异性下游 PCR Primer (Oligo-dT Primer 和 Random 引物不能使用) |
| 操作 | 在同一反应管中连续进行 RT-PCR 反应 |

● 使用注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前请一定认真阅读。

- 1) 当同时需要进行数次 RT-PCR 反应时，应先配制至少 10 次量各种试剂的混合液，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 PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 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) 2X 1 Step Buffer 使用前用 vortex 充分混匀，离心后使用。
- 4) 酶制品应在实验前才从 -20°C 中取出，使用后也应立即放回 -20°C 中保存。
- 5) 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。
- 6) 分装试剂时务必使用新的枪头，以防止样品间污染。
- 7) 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 Primer、Oligo dT Primer 不能使用。

● 实验操作

1. 按下列组成配制 RT-PCR 反应液。

| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
|---|---------------------------|-------------|
| PrimeScript 1 Step Enzyme Mix | 2 μ l | |
| 2X 1 Step Buffer | 25 μ l | |
| 上游 Primer (20 μ M) *1 (sense) | 1 μ l | 0.4 μ M |
| 下游 Primer (20 μ M) *2 (anti-sense) | 1 μ l | 0.4 μ M |
| Template RNA (or Positive Control RNA) | X μ l*3 1 μ l) | |
| RNase Free dH ₂ O | Up to 50 μ l | |

*1 Positive Control RNA 时使用 F-1 Primer。

*2 Positive Control RNA 时使用 R-1 Primer。

*3 Total RNA 的使用量建议在 1 μ g 以下。

2. 按以下条件进行 RT-PCR 反应。

Standard Condition

(A) 进行 3 Step PCR 反应时：

| | | |
|---------|----------|----------------|
| 50°C | 30 min | } 25~30 Cycles |
| 94°C | 2 min | |
| 94°C | 30 sec | |
| 55~65°C | 30 sec | |
| 72°C | 1 min/kb | |

(B) 进行 2 Step PCR 反应时：

| | | |
|------|----------|----------------|
| 50°C | 30 min | } 25~30 Cycles |
| 94°C | 2 min | |
| 98°C | 10 sec | |
| 68°C | 1 min/kb | |
| | | |

Positive Control RNA 反应时

| | | |
|------|--------|-------------|
| 50°C | 30 min | } 30 Cycles |
| 94°C | 2 min | |
| 94°C | 30 sec | |
| 60°C | 30 sec | |
| 72°C | 1 min | |

* Positive Control RNA 反应时可以确认到 462 bp 的 PCR 扩增产物。

● PCR 反应条件

■ 退火温度

对于 Positive Control RNA, 可设定退火温度为 60°C, 但检测样品的合适退火温度可以在 55~65°C 间进行研讨。有时也可将退火温度范围扩大到 45~65°C 进行研讨。

■ 延伸时间

延伸时间根据目的片段的长度而改变, *TaKaRa Ex TaqHS* 在 72°C 时的设定标准是 1 kb/min。

■ 循环次数

cDNA 量较少时, 循环次数可增加至 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。可以使用 Mighty TA-cloning Kit (Code No. 6028) 克隆到 T-Vector。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。

● 实验例

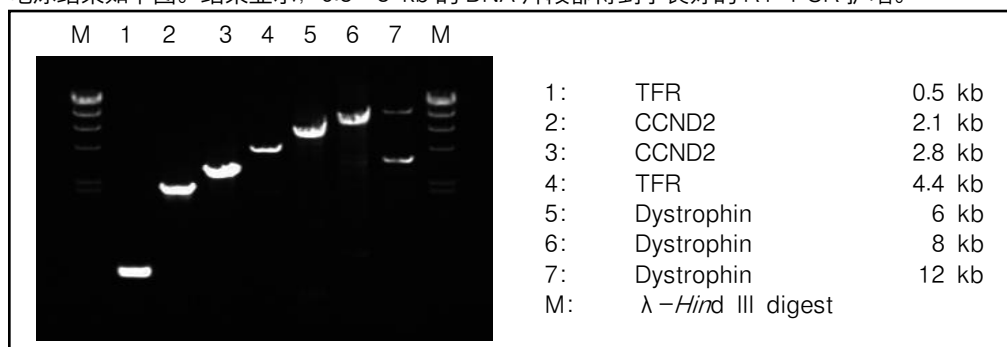
1. 使用 PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2, 以 human heart total RNA 或 HL60 cell total RNA 为模板, 扩增不同长度的片段。

| Target gene | Total RNA used |
|----------------------------|----------------|
| Dystrophin | Human heart |
| Transferrin receptor (TFR) | HL60 cells |
| Cyclin D2 (CCND2) | HL60 cells |

RT-PCR 反应条件:

| 0.5~6 kb | | 8~12 kb | | } 28 Cycles | } 28 Cycles |
|----------|----------|---------|-----------------|-------------|-------------|
| 50°C | 30 min | 50°C | 30 min | | |
| 94°C | 2 min | 94°C | 2 min | | |
| 94°C | 30 sec | 98°C | 10 sec | | |
| 55°C | 30 sec | 68°C | 8 min or 12 min | | |
| 72°C | 1 min/kb | | | | |

电泳结果如下图。结果显示, 0.5~8 kb 的 DNA 片段都得到了良好的 RT-PCR 扩增。



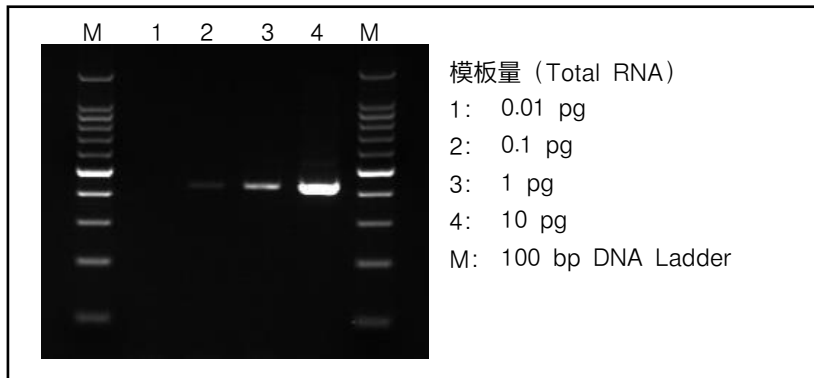
2. 使用 HL60 total RNA 为模板，使用本试剂盒按以下方法检测 GAPDH 基因。

Target: GAPDH 的 428 bp 的 DNA 片段。

RT-PCR 反应条件:

| | | |
|------|--------|-------------|
| 50°C | 30 min | |
| 94°C | 2 min | |
| 94°C | 30 sec | } 40 Cycles |
| 55°C | 30 sec | |
| 72°C | 1 min | |

电泳结果如下。结果显示，最低的 Total RNA 检出量为 0.1 pg 。



● 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。

另外，建议使用 RNase-OFF[®] (RNase decontamination solution) (Code No. 9037) 去除仪器和器具等的 RNase。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°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。

当从培养细胞和组织样品中快速提取高纯度的 Total RNA 时，可使用 NucleoSpin[®] RNA II (Code No. #740955.10/.50/.250) 或 AGPC 法试剂 RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)。

● 关联产品

PrimeScript™ Reverse Transcriptase (Code No. 2680A/B/C)
PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Dye Plus) (Code No. RR057A/B)
PrimeScript™ RT-PCR Kit (Code No. RR014A/B)
PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Code No. 6110A/B)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)
Agarose L03[TAKARA] (Code No. 5003/5003B)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve(Code No. 5810A))
RNase-OFF® (RNase decontamination solution) (Code No. 9037)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)
Mighty TA-cloning Kit (Code No. 6028)

TaKaRa Ex Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.

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

PrimeScript, 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.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>

v202108Da