

TaKaRa Code: D6210A

PrimeScript II
1st Strand cDNA Synthesis Kit
(50 次量)

说明书

TaKaRa

宝生物工程(大连)有限公司

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
●相关制品	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 的合成极为不利。PrimeScript II RTase 是对 PrimeScript RTase 进行进一步改良的反转录酶，本反转录酶可以极大地抑制 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℃，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

【引物序列】

引物名称	序列
Random 6 mers	Pd (N) 6
Oligo dT Primer	TaKaRa 独自开发设计的 dT 区域的序列 * 1

*1: 该序列与 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa Code: DRR019A) 中的 Oligo dT Adaptor Primer 不同，不含有 M13 Primer M4 序列。

● 保 存: -20℃。

●1st-Strand cDNA 合成反应

1. 在 Microtube 中配制下列混合液。

试剂	使用量
Oligo dT Primer (50 μM) or Random 6 mers (50 μM)	1 μl 1 μl (0.4~2 μl) *2
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: 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. 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	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℃) * 3 30~60 min

*3: 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。

6. 95℃ 5 min * 4 (酶失活) 后, 冰上冷却。
*4: 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, 进行最适模板量的研讨。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 扩增情况。

【推荐使用的 PCR 酶】

高扩增效率: *TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa Ex Taq HS*
长链 PCR 扩增: *TaKaRa LA Taq*、*TaKaRa LA Taq HS*
高保真 PCR 扩增: PrimeSTAR HS DNA Polymerase

●RNA样品的制备

本试剂盒是将 RNA 合成 cDNA 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（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（也可使用 RNA 实验用的一次性塑料容器），使用的无菌水需用 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。

从培养细胞、组织中提取 Total RNA 时，使用 RNAiso Plus（TaKaRa Code: D9108）。

●相关制品

【相关试剂盒】

高效率、高灵敏度、长链 2 Step RT-PCR 试剂盒：

PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa Code: DRR014)

高灵敏度的长链 One Step RT-PCR 试剂盒：

PrimeScript® One Step RT-PCR Kit Ver.2 (TaKaRa Code: DRR055)

【相关 PCR 酶】

高灵敏度、高扩增量的 PCR 酶：

TaKaRa Ex Taq (TaKaRa Code: DRR001)

TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa Code: DRR006)

长链 DNA 扩增酶：

TaKaRa LA Taq® (TaKaRa Code: DRR002)

TaKaRa LA Taq® Hot Start Version (TaKaRa Code: DRR042)

高保真酶：

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (TaKaRa Code: DR010)

MEMO

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
8008909508, 4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: service@takara.com.cn

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.03

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂