

TaKaRa Code: DRR055A

**PrimeScript[®] One Step RT-PCR
Kit Ver.2
(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	
●制品内容	1
●保 存	1
●原 理	2
●试剂盒特点	2
●RNA 样品制备	2
●使用注意	3
●实验操作	3
●实验例	4
●Q&A	5
	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。迄今为止, 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 (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。反转录反应使用了 TaKaRa 公司独自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模板也具有超强的延伸能力; 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 2×1 Step Buffer 的形式, 使实验操作时的反应液配制更为简单方便。

本试剂盒具有以下特点:

1. 进行高效的 RT-PCR 扩增。
 2. 操作简单。
 3. 反转录温度可以设定为 50℃, 能够有效抑制非特异性扩增。
 4. 使用本试剂盒扩增得到的目的产物 3' 端附有一个 A 碱基, 可以直接克隆于 T-Vector 中。
- 本试剂盒中含有进行 One Step RT-PCR 反应应用的全部试剂, 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. 2×1 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 kbp 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。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。

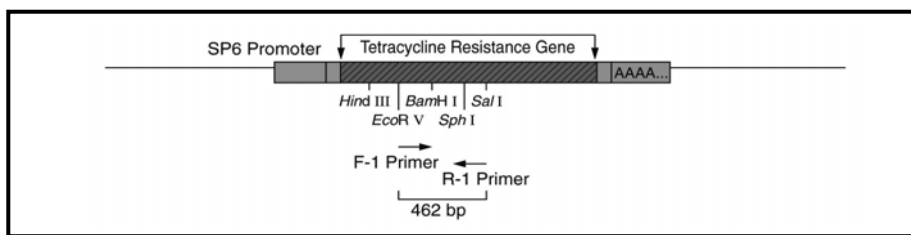


图 1. Positive Control RNA: 使用 Control Primer 可以扩增 462 bp 的 DNA 片段

●保存: -20℃

●原理

TaKaRa 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。

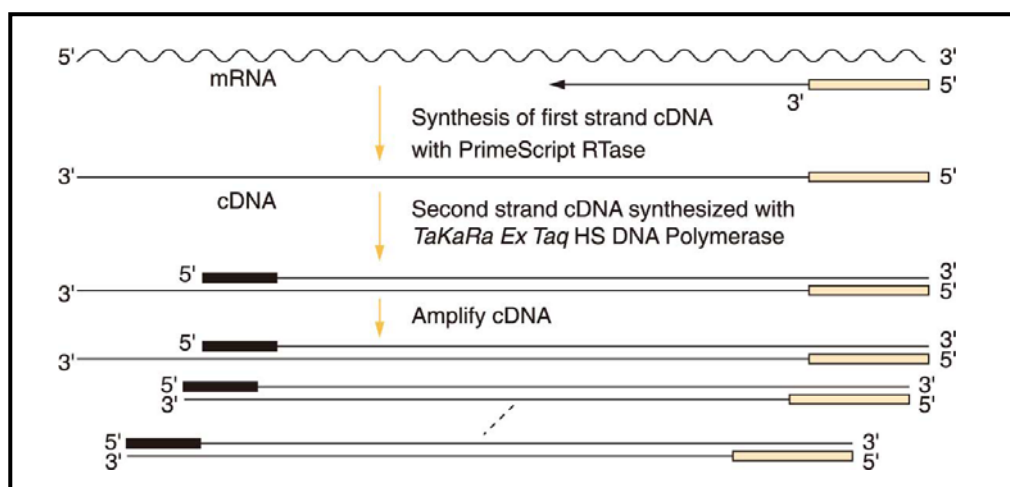


图 2. PrimeScript® One Step RT-PCR Kit Ver.2 原理图

●试剂盒特点

RNA 模板	适用于所有 RNA
扩增片段大小	8 kbp 以下
PrimeScript 1 Step Enzyme Mix	反转录酶 (PrimeScript® RTase)
	DNA Polymerase (<i>TaKaRa Ex Taq</i> ® HS)
	RNase Inhibitor
2×1 Step Buffer	含有反应 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)

●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℃ 下处理 12 小时。

(2) 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，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。

使用 RNAiso Plus (TaKaRa Code: D9108) 可以从培养细胞和组织样品中快速提取高纯度的 Total RNA。

使用 Catrimox-14™ RNA Isolation Kit Ver. 2.11 (TaKaRa Code: DWA005) 可从血液中快速提取高纯度的 Total RNA。

使用本试剂盒进行 One Step RT-PCR 反应时，每次反应所需的最适 Total RNA 量约为 1 μg。

●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) 2×1 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℃ 中取出，使用后也应立即放回 -20℃ 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℃ ~ -80℃。
- 6) 分装试剂时务必使用新的枪头 (Tip)，以防止样品间污染。
- 7) 最佳的 PCR 反应条件，因 PCR 扩增仪的不同而不同，所以在您使用您的样品之前最好先试做一下 Control 反应，以确定最佳的 PCR 反应条件。
- 8) 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。

PrimeScript 1 Step Enzyme Mix	2 μ l
2×1 Step Buffer	25 μ l
上游Primer (20 μ M) *1	1 μ l
下游Primer (20 μ M) *2	1 μ l
Template RNA (or Positive Control RNA)	X μ l*3
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。

(A) 进行 3 Step PCR 反应时:

50℃	30 min	
94℃	2 min	
94℃	30 sec	} 25~30 Cycles
55~65℃	30 sec	
72℃	1 min/kbp	

(B) 进行 2 Step PCR 反应时:

50℃	30 min	
94℃	2 min	
98℃	10 sec	} 25~30 Cycles
68℃	1 min/kbp	

Positive Control RNA 反应时:

50℃	30 min	RT 反应	
94℃	2 min	RTase 失活	
94℃	30 sec		} 30 Cycles
60℃	30 sec		
72℃	1 min		

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

3. 反应结束后, 取 PCR 反应液 (5~10 μ l) 进行琼脂糖凝胶电泳。

【PCR 条件设定】

■ 退火温度

检测样品的最适退火温度可以在 55~65℃间进行研讨。有时也可将退火温度范围扩大到 45~65℃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 Taq*® HS 在 72℃时的设定标准是 1 kbp/min。

■ 循环次数

cDNA 量较少时, 循环次数可增加到 40~50 次。

●实验例

1. 扩增不同长度 DNA 片段的 RT-PCR 实验。

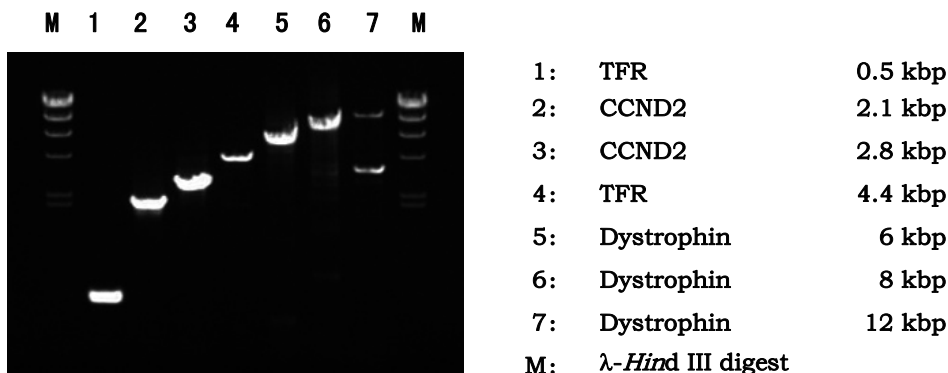
① Template: Human Heart Total RNA 和 HL60 Total RNA。

Target: 以 Human Heart Total RNA 为模板, 扩增 Dystrophin 基因的 6~12 kbp 的 DNA 片段; 以 HL60 Total RNA 为模板, 扩增 TFR 和 CCND2 基因的 0.5~4.4 kbp 的 DNA 片段。

② RT-PCR 反应条件:

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

③ 电泳结果如下图。结果显示, 0.5~8 kbp 的 DNA 片段都得到了良好的 RT-PCR 扩增。



2. RT-PCR 检出灵敏度实验。

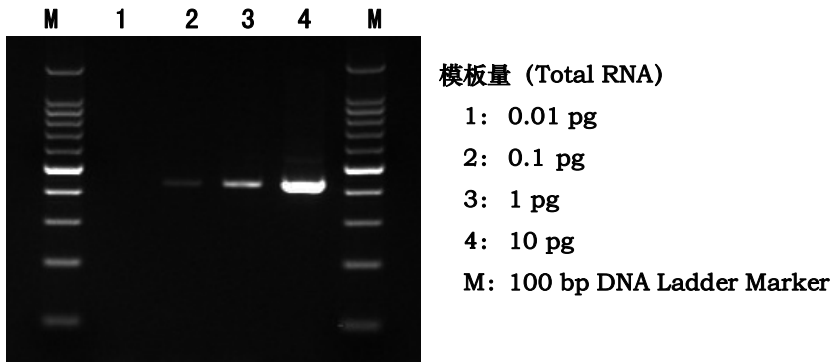
① Template: HL60 Total RNA。

Target: GAPDH 428 bp 的 DNA 片段。

② 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	

③ 电泳结果如下。结果显示，最低的 Total RNA 检出量为 0.1 pg。



●Q&A

Q1. RT-PCR 反应后无 DNA 扩增产物，怎么办？

A1. 首先应严格按说明书要求进行 Control 反应。如 Control 反应情况正常，说明实验操作方面没有问题，应从您提取的 RNA 样品的纯度和添加量、引物的设计情况、参考文献的可信度以及 RT-PCR 反应条件的设定等方面加以考虑；如 Control 反应不正常，应从实验操作的准确性、实验器具处理、PCR 仪的条件设定等方面加以考虑。

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>

V2010.04

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