

Code No. RR057A

研究用

TaKaRa

PrimeScript™ One Step
RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus)

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	3
● 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	6
● 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 不能直接被扩增, 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, 避免污染危害。同时反应液中已含有电泳时所必需的色素试剂 (蓝色和黄色色素), 反应后可以直接进行电泳。反应液为鲜艳的绿色 (Emerald Green), 电泳时指示效果明显, 容易观察样品的电泳位置。反转录反应使用了具有很强延伸能力的反转录酶 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。反应试剂已优化, 以实现与不含染料和 loading buffer 的传统 RT-PCR 系统具有相同反应效果。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 (Dye Plus) 的形式, 使反应液配制和电泳检测更为简单方便。

本试剂盒具有以下特点:

1. 进行高效的 RT-PCR 扩增。
2. 反应液制备简单, 可直接进行凝胶电泳。
3. 反转录温度可以设定为 50°C, 能够有效抑制非特异性扩增。
4. 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 (Dye Plus)	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 聚合酶经体外转录而得到的。

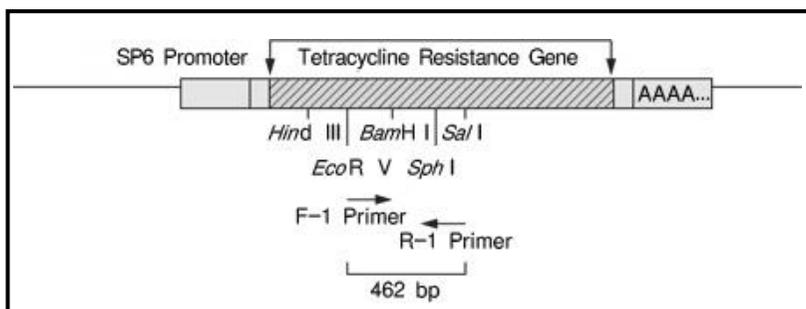


图 1. Positive Control RNA: 使用 Control Primer 可以扩增 462 bp 的 DNA 片段

● Kit 外所需材料

1. PCR 仪

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

Agarose L03 [TAKARA] (Code No. 5003/5003B),

PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (Code No. 5810A), 等。

3. 电泳仪

Mupid-2plus (Code No. M-2P), Mupid-exU (Code No. EXU-1)等。

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 (Dye Plus) 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。

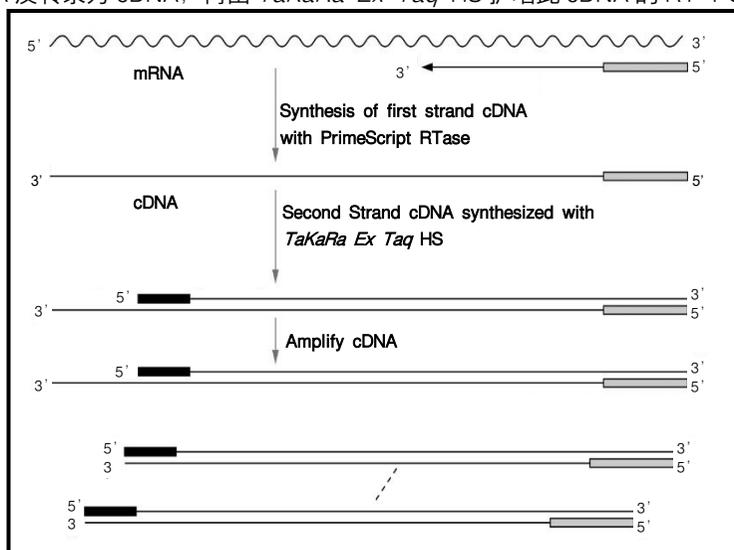


图 2. PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus) 原理图

● 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 (Dye Plus)	反应 Buffer dNTP Mixture (终浓度 400 μ M) 1 Step Enhancer Solution 色素、比重剂
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) 2X 1 Step Buffer (Dye Plus) 使用前用 Vortex 充分混匀，离心后使用。
- 4) 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。
- 5) 为了防止 Positive Control RNA 分解，应尽量避免反复冻融。有条件的实验室建议保存于 -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 (Dye Plus)	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 conditions

(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.	} 25 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。

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

* 电泳时色素 Marker 的位置: 5 μ l PCR 反应液, 1% Agarose L03 电泳时, 蓝色色素在 3-5 kb 附近, 黄色色素在 50 bp 以下位置。

● PCR 反应条件

■ 变性条件

变性条件视 PCR 仪器和使用的 tube 不同而各异。推荐 98°C 5-10 sec.或 94°C 20-30 sec.。

■ 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 Taq HS* 在 72°C 时的设定标准是 1 kb/min.。

■ 循环次数

cDNA 量较少时, 循环次数可增加到 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。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. 以 mouse heart total RNA 或 HL60 cells total RNA 为模板, 1 step RT-PCR 扩增不同长度目的片段。

Target gene	Total RNA*
Dystrophin	mouse heart
Transferrin receptor (TFR)	HL60 cells
Cyclin D2 (CCND2)	HL60 cells

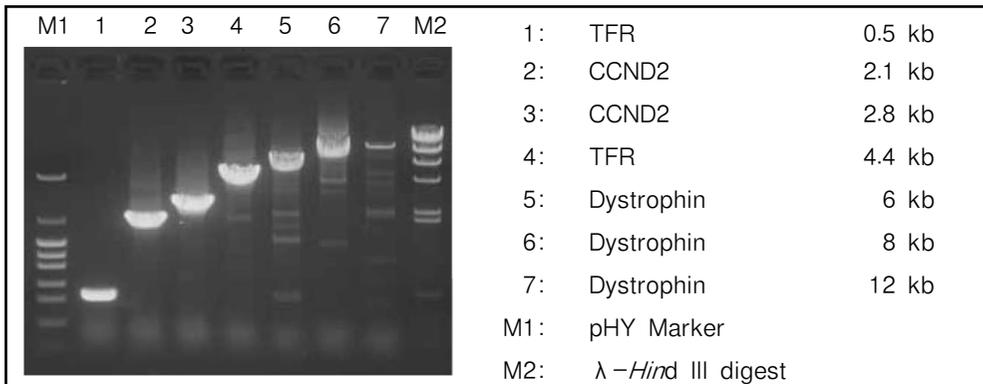
*使用 1 μ g Total RNA

RT-PCR 反应条件:

0.5~6 kb		8~12 kb	
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	1 min./kb
72°C	1 min./kb		

} 30 cycles } 30 cycles

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。

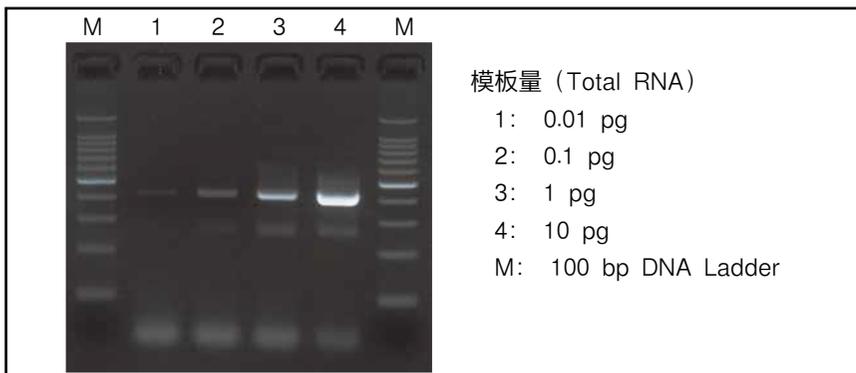
Target: GAPDH 428 bp 的 DNA 片段。

RT-PCR 反应条件:

50°C	30 min.
94°C	2 min.
94°C	30 sec.
55°C	30 sec.
72°C	1 min.

} 40 cycles

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



● 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[®] (Code No. 9037) 去除仪器和器具等上的 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，可以使用 NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250) 或 AGPC 法试剂 RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)。对于血液样品，可以使用 NucleoSpin RNA Blood (Code No. 740200.10/.50) 和 RNAiso Blood (Code No. 9112/9113)。

● 关联产品

PrimeScript™ Reverse Transcriptase (Code No. 2680A/B/C)
PrimeScript™ II Reverse Transcriptase (Code No. 2690A/B/C)
PrimeScript™ RT-PCR Kit (Code No. RR014A/B)
PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (Code No. R022A/B)
PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit (Code No. R023A/B)
PrimeScript™ One step RT-PCR Kit Ver.2 (Code No. RR055A/B)
PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Code No. 6110A/B)
PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Code No. 6210A/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)
RNase-OFF[®] (RNase Decontamination Solution) (Code No. 9037)
NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250)
NucleoSpin RNA Blood (Code No. 740200.10/.50)
RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)
RNAiso Blood (Code No. 9112/9113)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (Code No. 6027)

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>

v202110Da