

TaKaRa Code: D2680A

PrimeScript[®] Reverse Transcriptase

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
●包 装	1
●保 存	1
●酶贮存溶液	1
●起 源	1
●活性定义	1
●纯 度	1
●用 途	1
●添附 Buffer 组成	1
●1st-Strand cDNA 合成的实验操作方法	2
●使用 Mouse Heart Total RNA 进行 RT-PCR 反应的实验例	2
●使用 HL60 Total RNA 进行 Human TFR 基因（4.4 kbp）的 RT-PCR 反应的实验例	4
●使用本制品进行 2 Step Real Time RT-PCR 反应的实验例	5

● 制品说明

PrimeScript Reverse Transcriptase是TaKaRa公司独自开发的一种新型RNase H⁻型反转录酶。本酶具有极强的延伸能力，能够有效地合成 1st-strand cDNA，即使对有复杂二级结构的RNA，在 42℃条件下也能得到良好的反应效果，无需进行高温反转录反应，高温的反转录反应会导致RNA的降解。本酶适合于长链cDNA的合成及高比例的全长cDNA文库的构建等。本酶具有以下特性：

- 超强的延伸能力
本反转录酶可以对 10kb 以上的 RNA 模板进行良好的反转录反应。
- 良好的反转录效率
本反转录酶可以对极少量的 RNA 模板进行良好的反转录反应。
- 复杂结构 RNA 的反转录性能
本反转录酶在标准的反转录温度条件下（42℃）对高 GC 含量的 RNA 模板能够进行良好的反转录反应。

● 包装：

PrimeScript Reverse Transcriptase (200 U/μl)	10,000 Units
5×PrimeScript Buffer	500 μl

● 保存： -20℃。

● 酶贮存溶液

Tris-HCl (pH7.8)	20 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1.0 mM
DTT	1.0 mM
Glycerol (V/V)	50 %

● 起源： Purified from an *E.coli* strain expressing a recombinant enzyme

● 活性定义

以Poly (rA) · Oligo (dT) 为模板/引物，在 37℃、10 分钟条件下，掺入 1 nmol的 [³H] dTTP所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

● 纯度：

- 1) 200 U 的本酶和 1 μg 的 λ DNA-*Hind* III 在 37℃下反应 1 小时，DNA 的电泳谱带不发生变化。
- 2) 200 U 的本酶和 1 μg 的 Supercoiled pBR322 DNA 在 37℃下反应 1 小时，DNA 的电泳谱带不发生变化。
- 3) 200 U 的本酶和 1 μg 的 16S, 23S rRNA 在 37℃下反应 1 小时，RNA 的电泳谱带不发生变化。

● 用途：

- 1) 1st-Strand cDNA 的合成。
- 2) cDNA Probe 的制备。
- 3) 普通 RT-PCR 反应以及 Real Time RT-PCR 反应。

● 添附 Buffer 组成（保存：-20℃）

5×PrimeScript Buffer (cDNA 合成用)

Tris-HCl (pH8.3)	250 mM
KCl	375 mM
MgCl ₂	15 mM

●1st-Strand cDNA 合成的实验操作方法

1. 在 Microtube 管中配制下列混合液。

试剂名称	使用量
模板 RNA	1 μg^*
Oligo dT Primer (50 μM) 或 Random Primers (50 μM) 或 Specific Primer (2 μM)	1 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
RNase free dH ₂ O	up to 10 μl

* Total RNA 的使用量一般为 5 μg 以下；mRNA 的使用量一般为 1 μg 以下。

2. 65℃保温 5 分钟后迅速在冰上急冷 2 分钟以上。
3. 离心数秒钟使模板 RNA/引物等的混合液聚集于 Microtube 管底部。
4. 在上述 Microtube 管中配制下列反转录反应液。

试剂名称	使用量
上述模板 RNA/引物等的混合液	10 μl
5×PrimeScript Buffer	4 μl
RNase Inhibitor (40 U/ μl)	0.5 μl
PrimeScript Reverse Transcriptase (200 U/ μl)	100~200 units
RNase free dH ₂ O	up to 20 μl

5. 30℃ 10 min*
42℃(~50℃) ** 30~60 min

* 以 Random Primers 作为反转录引物时应先进行 30℃，10 分钟反应。

** PrimeScript Reverse Transcriptase 延伸能力强，通常情况下，即使模板 RNA 具有复杂的二级结构，也可以在 42℃下进行反转录反应。但当反转录引物使用 PCR 的下游引物时，由于引物错配的原因等易发生非特异性反应，这时可以将反转录温度设为 50℃。

6. 70℃保温 15 分钟后冰上冷却，得到的 cDNA 溶液可直接用于 2nd-Strand cDNA 的合成或者 PCR 扩增等，PCR 扩增时，cDNA 溶液的使用量建议使用 1~5 μl 。

●使用 Mouse Heart Total RNA 进行 RT-PCR 反应的实验例

使用 Mouse Heart Total RNA，分别进行 RT-PCR 反应，扩增了 2 kbp、6 kbp、8 kbp 和 12 kbp 的目的 DNA 片段。

1. 反转录反应

- ① 在 Microtube 管中配制下列混合液。

试剂名称	使用量
Mouse Heart Total RNA	1 μl^*
Oligo dT Primer (50 μM)	1 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
RNase free dH ₂ O	up to 10 μl

* Mouse Heart Total RNA 使用量分别为 1 μg 、100 ng、10 ng。

- ② 65℃保温 5 分钟后迅速在冰上急冷 2 分钟以上。
- ③ 离心数秒钟使模板 RNA/引物等的混合液聚集于 Microtube 管底部。

④ 在上述 Microtube 管中配制下列反转录反应液。

试剂名称	使用量
上述模板 RNA/引物等的混合液	10 μ l
5×PrimeScript Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0.5 μ l
PrimeScript Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	0.5 μ l
RNase free dH ₂ O	up to 20 μ l

⑤ 42℃保温 30 分钟。

⑥ 70℃保温 15 分钟后冰上冷却，得到的 cDNA 溶液用于 PCR 扩增。

2. PCR 反应

① 按下列组成配制 PCR 反应液，全量 50 μ l。

试剂名称	使用量
上述 cDNA 溶液	2 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μ l
Forward Primer (10 μ M)	1 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l
10×LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ Plus)	5 μ l
TaKaRa LA Taq (5 U/ μ l)	0.5 μ l
dH ₂ O	up to 50 μ l

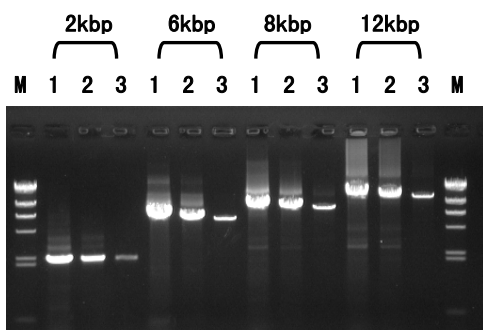
② PCR 反应条件如下：

2 kbp、6 kbp、8 kbp、12 kbp的PCR反应条件

94℃	1 min	
98℃	20 sec	
68℃	2/6/8/12 min	} 30 Cycles
72℃	10 min	

3. RT-PCR 扩增结果

PCR 反应结束后，取 5 μ l 的 PCR 反应液进行了琼脂糖凝胶电泳，结果如下。



M: λ -Hind III digest DNA Marker

1: Total RNA 1 μ g 的 RT-PCR 扩增结果

2: Total RNA 100 ng 的 RT-PCR 扩增结果

3: Total RNA 10 ng 的 RT-PCR 扩增结果

● 使用 HL60 Total RNA 进行 Human TFR 基因（4.4 kbp）的 RT-PCR 反应的实验例

1. 反转录反应

① 在 Microtube 管中配制下列混合液。

试剂名称	使用量
HL60 Total RNA (100 ng/μl)	1 μl
Oligo dT Primer (50 μM)	1 μl
dNTP Mixture(10 mM each)	1 μl
RNase free dH ₂ O	up to 10 μl

② 65℃保温 5 分钟后迅速在冰上急冷 2 分钟以上。

③ 离心数秒钟使模板 RNA/引物等的混合液聚集于 Microtube 管底部。

④ 在上述 Microtube 管中配制下列反转录反应液。

试剂名称	使用量
上述模板 RNA/引物等的混合液	10 μl
5×PrimeScript Buffer	4 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.5 μl
PrimeScript Reverse Transcriptase (200 U/μl)	0.5 μl
RNase free dH ₂ O	up to 20 μl

⑤ 42℃保温 30 分钟。

⑥ 70℃保温 15 分钟后冰上冷却，得到的 cDNA 溶液用于 PCR 扩增。

2. PCR 反应

① 按下列组成配制 PCR 反应液，全量 50 μl。

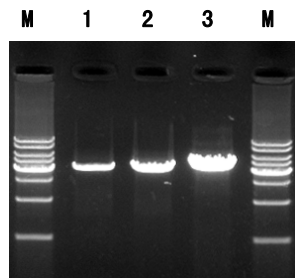
试剂名称	使用量
上述 cDNA 溶液	分别取 1、2、5 μl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	8 μl
Forward Primer (10 μM)	1 μl
Reverse Primer (10 μM)	1 μl
10×LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ Plus)	5 μl
TaKaRa LA Taq (5 U/μl)	0.5 μl
dH ₂ O	up to 50 μl

② PCR 反应条件如下：

94℃	1 min	
94℃	30 sec	} 30 Cycles
55℃	30 sec	
72℃	5 min	
72℃	10 min	

3. RT-PCR 扩增结果

PCR 反应结束后，取 5 μ l 的 PCR 反应液进行了琼脂糖凝胶电泳，结果如下。



M: 1 kbp DNA Ladder (TaKaRa Code: D517A)

1: 1 μ l cDNA 溶液扩增结果

2: 2 μ l cDNA 溶液扩增结果

3: 5 μ l cDNA 溶液扩增结果

●使用本制品进行 2 Step Real Time RT-PCR 反应的实验例

本实验以Mouse Liver Total RNA为模板，使用 2 Step Real Time RT-PCR方法，扩增Mouse GAPDH 基因。实验时，首先以Mouse Liver Total RNA为模板进行反转录反应，然后将得到的cDNA溶液使用 EASY Dilution按 10 倍梯度稀释，再将相当于 1 pg~100 ng Total RNA量的cDNA作为模板，进行Real Time PCR扩增（使用了SYBR® Green I嵌合荧光法），制作标准曲线。具体实验过程如下：

1. 反转录反应

以 Mouse Liver Total RNA 为模板进行反转录反应。

① 按下列组成配制 RT 反应液（反应液请在冰上配制）。

试剂名称	使用量
5×PrimeScript Buffer	2 μ l
dNTP Mixture (10 mM each)	0.5 μ l
Random 6 mers (100 μ M)*1	0.5 μ l
PrimeScript Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	0.25 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0.25 μ l
Total RNA	500 ng
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μ l*2

*1 反转录引物可使用以下三种引物，使用量分别如下：

Random 6 mers (100 μ M) 0.5 μ l (50 pmol)

Oligo dT Primer (50 μ M) 0.5 μ l (25 pmol)

Specific Primer (2 μ M) 0.5 μ l (1 pmol)

*2 反应体积可按需求相应放大，10 μ l 的反应体系中 Total RNA 的最大使用量为 500 ng。

② 反转录反应条件如下：

42℃ 10 min（反转录反应）

95℃ 2 min（反转录酶的失活反应）

2. Real Time PCR 反应

Target: Mouse GAPDH。

Template: Mouse Liver Total RNA 经反转录反应后的 cDNA 溶液。

使用EASY Dilution (TaKaRa Code: D9160) 将cDNA溶液按 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 倍梯度稀释（10 倍梯度稀释）后，各取 2 μ l进行Real Time PCR反应。此时 25 μ l PCR反应液中的cDNA添加量分别相当于从 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg的Total RNA反转录得到的cDNA量。

Negative Control 的模板使用了灭菌蒸馏水。

扩增长度： 108 bp。
使用仪器： Smart Cycler System。
检测方法： SYBR® Green I 嵌合荧光法。

① 按下列组成配制 Real Time PCR 反应液（反应液请在冰上配制）。

PCR反应使用了SYBR® *Premix Ex Taq*TM (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR041)。

试剂名称	使用量
SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> TM (2×)	12.5 μl
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	9.5 μl
Total Volume	23 μl

② 将上述 PCR 反应液加入至 Real Time PCR 用反应管中，然后再加入 2 μl*的上述各 cDNA 的梯度稀释液。

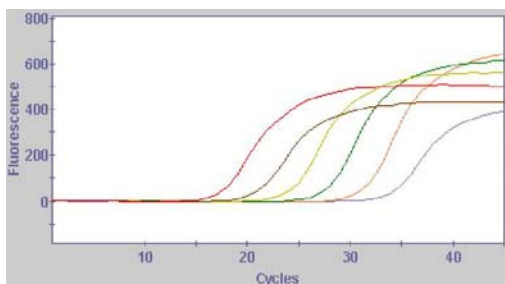
* RT 反应液(即各 cDNA 的梯度稀释液)的加入量不要超过 Real Time PCR 反应总体积的 1/10 (V/V) 量。

③ 进行 Real Time PCR 反应，PCR 反应条件如下：

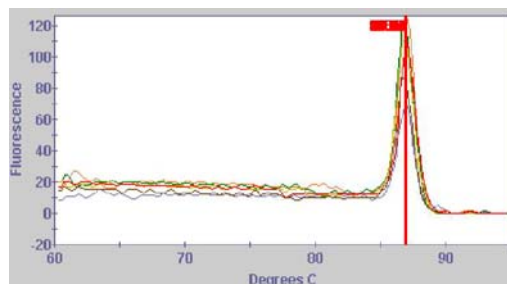
95℃ 10 sec 1 Cycle
95℃ 5 sec } 45 Cycles
60℃ 20 sec }

④ Real Time PCR 反应结果。

Real Time PCR 扩增曲线图及融解曲线图如下：

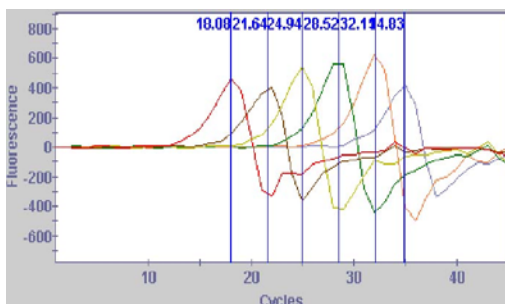


扩增曲线图

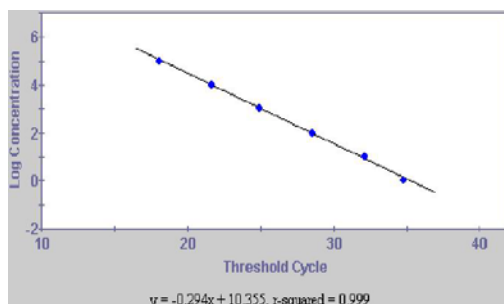


融解曲线图

反应结束后，根据扩增曲线的 2nd derivative 得到各扩增曲线的 Ct 值，制作标准曲线。



2nd derivative



标准曲线图

⑤ 结果分析。

本实验检测到了 Mouse Liver Total RNA 1 pg~100 ng 相当量的 cDNA。分析融解曲线可知，无论哪一种浓度的模板都能够得到单一的 PCR 扩增产物。同时标准曲线的线性关系良好，在实验浓度范围内能够进行准确定量。

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>

V2010.06

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