

Code No. RR037A

研究用

TaKaRa

PrimeScript™ RT reagent Kit
(Perfect Real Time)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 特 长	1
● 使用注意	2
● 操作方法：反转录反应	2
● 操作方法：Real Time PCR 反应	3
● 附 录	6
● 关联产品	8

● 制品说明

本制品是 Real Time RT-PCR 用的理想反转录反应试剂。使用具有较强延伸能力的 PrimeScript RTase 可以在较短时间内高效合成 Real Time PCR 用 cDNA。操作简单, 适合进行高通量分析。进行 2 Step Real Time RT-PCR 反应时, 与 TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B)、TB Green Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B), TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420Q/A/B)、或 Probe qPCR Mix (Code No. RR391S/A/B) 试剂配合使用, 能进行高性能的基因表达分析。

本制品提供了 TB Green 分析法和探针分析法各自适合的反应体系, 可以根据分析方法选择体系。

● 制品内容 (10 μl 反应×200 次)

1. 5X PrimeScript Buffer (for Real Time) *1	400 μl
2. PrimeScript RT Enzyme Mix I*2	100 μl
3. Oligo dT Primer (50 μM)	100 μl
4. Random 6 mers (100 μM)	400 μl
5. RNase Free dH ₂ O	1 ml
6. EASY Dilution (for Real Time PCR) *3	1 ml

*1 含有 dNTP Mixture 和 Mg²⁺。

*2 含有 RNase Inhibitor。

*3 用于制作标准曲线时梯度稀释 total RNA 和 cDNA。EASY Dilution (for Real Time PCR) 可以将其稀释至很低浓度也能够得到准确地稀释。本制品不影响反转录和 PCR 反应, 用其稀释后的样品可直接使用。EASY Dilution (for Real Time PCR) 也可以单独购买 (Code No. 9160/9160Q)。

注意: EASY Dilution 请与本公司 Real Time PCR 试剂组合使用, 对于其他公司的同类制品的适用性本公司尚未进行确认。

试剂盒外必备材料

热循环仪 (或 37°C、42°C 水浴和 85°C 加热块)

反转录反应所用 0.2 ml 和 1.5 ml 的微量反应管

微量移液器和枪头 (高压灭菌)

● 保存: -20°C。

● 特 长

1. 可以快速、高效合成 Real Time PCR 用 cDNA, 是进行 2 Step Real Time RT-PCR 反应的理想试剂。
2. 含有 Oligo dT Primer 和 Random 6 mers 两种反转录引物, 可根据实际情况区别使用。反转录反应可以使用 Random 6 mers 或 Oligo dT Primer, 也可以 Oligo dT Primer 和 Random 6 mers 同时使用。只扩增一种目的基因时, 也可以使用 Specific Primer 作为反转录引物。
3. 本制品提供了 TB Green qPCR 分析法和探针 qPCR 分析法各自适合的反应体系, 可以根据分析方法选择体系。

注意: 以下是 TB Green qPCR 分析法和探针 qPCR 分析法进行反转录实验的区别。

①用于反转录实验 RT Primer Mix 添加量。

②用于反转录实验 total RNA 的添加量。

4. Real Time RT PCR 定量需要建立标准曲线, 建立标准曲线的条件就是需要将总 RNA 和反转录 cDNA 稀释到较低的浓度。如果用水或 TE Buffer 稀释时, 由于模板浓度低不稳定, 因而会缩小小曲线范围, 结果准确度降低。本制品中附加了标准曲线制作用稀释液 EASY Dilution (for Real Time PCR), 将 Total RNA 或 cDNA 稀释至低浓度时也能够进行准确稀释, 容易在宽广范围内获得准确量的标准曲线。

● 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反应时，应先配制各种试剂的混合液（Master Mix；其中包括 RNase Free dH₂O、Buffer、酶等），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. PrimeScript RT Enzyme Mix I 使用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。同时，要使用精确、量程适合的移液枪，并且不要使 Tip 插入液面过深，否则会因 Tip 壁粘着造成损失。
3. 分装试剂时务必使用新的枪头（Tip），以防止样品间污染。

● 操作方法：反转录反应

（参考“附录.RNA 样品的制备”）

【TB Green qPCR 分析法】

1. 按下列组分配制 RT 反应液（反应液配制请在冰上进行）。为了保证反应液配制的准确性，减少分装时造成的误差，应按照比实际用量稍大的体积配制反应液，最后加入 RNA 样品。

试剂	使用量	终浓度
5X PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 μ l	1X
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μ l	
Oligo dT Primer (50 μ M) *1	0.5 μ l	25 pmol
Random 6 mers (100 μ M) *1	0.5 μ l	50 pmol
Total RNA		
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μ l*2	

*1 Random 6 mers 和 Oligo dT Primer 同时使用，可有效地将全长 mRNA 反转录成 cDNA。
使用单引物进行反转录时，使用量分别如下：

Primer	Amount	Total Amount (pmol)
Oligo dT Primer (50 μ M)	0.5 μ l	25 pmol
Random 6 mers (100 μ M)	0.5 μ l	50 pmol
Gene specific primer (2 μ M)	0.5 μ l	1 pmol

*2 反应体系可按需求相应放大，10 μ l 反应体系可最大使用 500 ng 的 Total RNA。

2. 反转录反应条件如下：

37°C 15 min *3（反转录反应）

85°C 5 sec（反转录酶的失活反应）

4°C

*3 应用 Gene Specific Primer 时，建议反转录反应条件设置为 42°C 15 min。PCR 反应有非特异性扩增时，将温度升到 50°C 会有所改善。

注意：将得到的 RT 反应液加入到下一步的 Real Time PCR 反应体系中，其加入量不要超过 Real Time PCR 反应体积的 1/10 (V/V) 量。

反转录反应体系不建议使用【探针 qPCR 分析法】用的操作方法（第 3 页），因进行 Real Time PCR 时，TB Green 的背景可能会过高。

【探针 qPCR 分析法】

1. 按下列组分配制 RT 反应液（反应液配制请在冰上进行）。为了保证反应液配制的准确性，减少分装时造成的误差，应按照比实际用量稍大的体积配制反应液，最后加入 RNA 样品。

试剂	使用量	终浓度
5X PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 μ l	1X
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μ l	
Oligo dT Primer (50 μ M) *1	0.5 μ l	25 pmol
Random 6 mers (100 μ M) *1	2 μ l	200 pmol
Total RNA		
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μ l*2	

*1 Random 6 mers 和 Oligo dT Primer 同时使用, 可有效地将全长 mRNA 反转录成 cDNA。
使用单引物进行反转录时, 使用量分别如下:

Primer	Amount	Total Amount (pmol)
Oligo dT Primer (50 μ M)	0.5 μ l	25 pmol
Random 6 mers (100 μ M)	2 μ l	200 pmol
Gene specific primer (2 μ M)	0.5 μ l	1 pmol

*2 反应体系可按需求相应放大, 10 μ l 反应体系可最大使用 1 μ g 的 Total RNA。

2. 反转录反应条件如下:

37°C 15 min *3 (反转录反应)

85°C 5 sec (反转录酶的失活反应)

4°C

*3 应用 Gene Specific Primer 时, 建议反转录反应条件设置为 42°C 15 min。PCR 反应有非特异性扩增时, 将温度升到 50°C 会有所改善。

注意: 将得到的 RT 反应液加入到下一步的 Real Time PCR 反应体系中, 其加入量不要超过 Real Time PCR 反应体积的 1/10 (V/V) 量。

反转录反应体系也可以使用【TB Green qPCR 分析法】用的操作方法 (第 2 页), 此时, 10 μ l 反应体系可最大使用 500 ng 的 Total RNA。

● 操作方法: Real Time PCR 反应

以下是使用本制品进行反转录反应后, 选择 TB Green *Premix Ex TaqII* (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A/B) 进行 Real Time PCR 反应的操作方法。

◆ 应用 Thermal Cycler Dice™ Real Time System // (终卖) 扩增仪的操作方法

1. 按下列组分配制 PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

试剂	使用量	终浓度
TB Green <i>Premix Ex TaqII</i> (Tli RNaseH Plus) (2X)	12.5 μ l	1X
PCR Forward Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M*1
PCR Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M*1
RT 反应液 (cDNA 溶液) *2	2 μ l	
灭菌水	8.5 μ l	
Total	25 μ l*3	

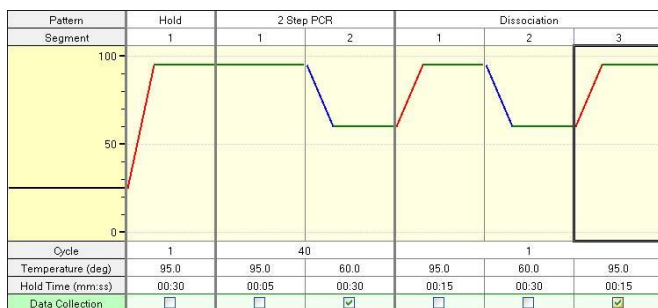
*1 通常引物终浓度为 0.4 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在 0.2~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

*2 建议在 25 μ l 反应液中使用相当于 10 pg~100 ng Total RNA 量的 cDNA 为模板。
反转录反应液的加入量不能超过 PCR 反应液总体积的 10%。

*3 建议反应体积为 25 μ l。

2. 进行 Real Time PCR 反应。

建议采用下列图表显示的两步法 PCR 反应程序。如果该程序得不到良好的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化。当使用 Tm 值较低的引物或两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。



两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性

Cycle: 1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Cycles: 40

95°C 5 秒

60°C 30 秒

Dissociation

◆特别提示：

本产品中使用的 *TaKaRa Ex Taq*[®] HS 是利用抗 *Taq* 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶，在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、30 秒。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。

3. 实验结果分析。

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。分析方法参见仪器的操作手册。

◆ 应用 Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR System 的操作方法

1. 按下列组分配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	使用量	使用量	终浓度
TB Green Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus) (2X)	10 μl	25 μl	1X
PCR Forward Primer (10 μM) *1	0.8 μl	2 μl	0.4 μM*1
PCR Reverse Primer (10 μM) *1	0.8 μl	2 μl	0.4 μM*1
ROX Reference Dye or Dye II (50X) *2	0.4 μl	1 μl	1X
RT 反应液 (cDNA 溶液) *3	2 μl	4 μl	
灭菌水	6 μl	16 μl	
Total	20 μl*4	50 μl*4	

*1 通常引物终浓度为 0.4 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.2~1.0 μM 范围内调整引物浓度。

*2 ROX Reference Dye II (50X) 比 ROX Reference Dye (50X) 浓度低，使用 7500 Real-Time PCR System 和 7500 Fast Real-Time PCR System 时，请使用 ROX Reference Dye II (50X)。使用 Applied Biosystem 7300 Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR System 时，请使用 ROX Reference Dye (50X)。

*3 建议在 20 μl 反应液中使用相当于 10 pg~100 ng Total RNA 量的 cDNA 为模板。反转录反应液的加入量不能超过 PCR 反应液总体积的 10%。

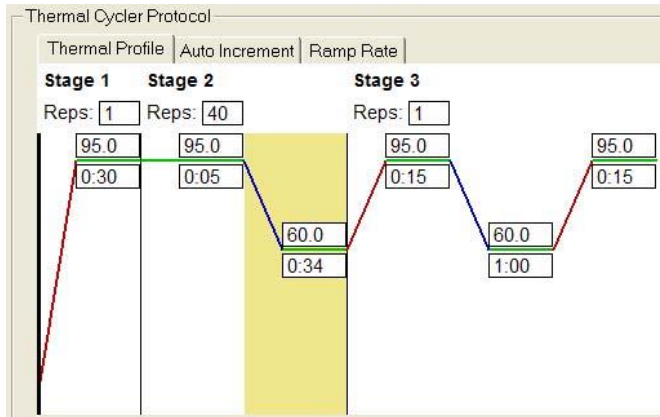
*4 按不同仪器的要求体积配制反应液。

2. 进行 Real Time PCR 反应。

建议采用下列图表显示的两步法 PCR 反应程序。如果该程序得不到良好的实验结果时，再进行 PCR 条件

的优化。当使用 Tm 值较低的引物或两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

< Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System 和 StepOnePlus >



两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1：预变性

Reps: 1

95°C 30 秒

Stage 2：PCR 反应

Reps: 40

95°C 5 秒

60°C 30~34 秒*

Dissociation Stage

* 使用 StepOnePlus 时请设定在 30 秒。

使用 7300 时请设定在 31 秒。

使用 7500 时请设定在 34 秒。

<Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System>

两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1：预变性

Number of cycle: 1

95°C 30 秒

Stage 2：PCR 反应

Number of Cycles: 40

95°C 3 秒

60°C 30 秒

Dissociation Stage

◆特别提示：

本制品中使用的 *TaKaRa Ex Taq*HS 是利用抗 *Taq* 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶，在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、30 秒。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。

3. 实验结果分析。

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。

分析方法参见仪器的操作手册。

● 附录

A. 实验例：反转录反应时间和 cDNA 合成量的研讨实验

1. 反转录反应

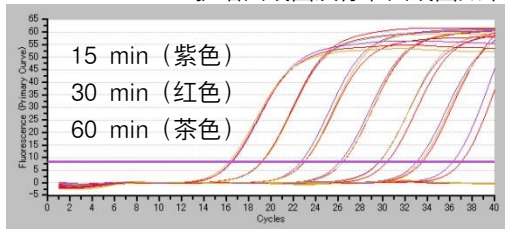
试剂: PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)
模板: Mouse Liver Total RNA (2 pg~2 μg 和灭菌水)
反应体积: 20 μl
RT-Primer: Random 6 mers
反应条件: 37°C 15、30、60 min 反应后 85°C 5 sec, 4°C 保存。

2. Real Time PCR 反应

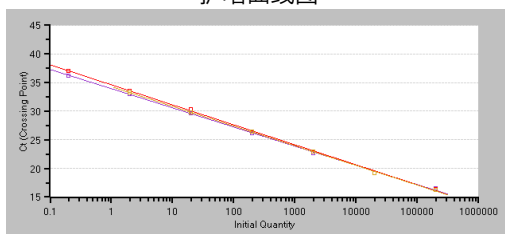
试剂: TB Green Premix Ex Taq (Perfect Real Time)
模板: 上述反转录反应液 2 μl
反应体积: 25 μl
Target Gene: *Actb*
反应条件: Thermal Cycler Dice Real Time System 标准反应条件

3. Real Time PCR 反应结果

Real Time PCR 扩增曲线图及标准曲线图如下:



扩增曲线图



标准曲线图

	Time	RSq	Eff (%)	Standard Curve
紫色	15 min	0.999	92.3	$Y = -3.522 \text{LOG}(X) + 33.94$
红色	30 min	0.999	93.3	$Y = -3.495 \text{LOG}(X) + 34.61$
茶色	60 min	0.999	95.2	$Y = -3.441 \text{LOG}(X) + 34.28$

以上 Real Time RT-PCR 扩增结果显示, 不同反转录反应时间 (15、30、60 min) 在宽广模板量范围内都可以得到同等的扩增效率。

B. RNA 样品制备

本制品是将 RNA 反转录成 cDNA 的专用试剂。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、组织中提取时，使用 RNAiso Plus（Code No. 9108/9109）。纯化的 RNA 用灭菌水或灭菌的 TE 缓冲液溶解。

【Total RNA 中混有基因组 DNA 的对策】

提取的 Total RNA 中常常混有基因组 DNA，而基因组 DNA 可以直接作为 PCR 模板进行扩增，造成解析结果不准确。为了避免这种情况发生，我们必须采取如下两种措施：1、引物设计时避免基因组 DNA 扩增；2、使用 DNase I 处理除去基因组 DNA。

1、引物设计时避免基因组 DNA 扩增

我们可以利用基因组 DNA 具有外显子和内含子的结构，在引物设计上下工夫，使 PCR 反应时不能扩增基因组 DNA。此时我们首先应确认目的基因的基因组结构，选择较长的内含子。然后，在这个内含子两侧的外显子上分别设计上、下游引物。Real Time PCR 反应时通常扩增的目的 DNA 片段长度都比较短，设置的条件也是适合短片段 DNA 的扩增。所以，当内含子足够长时，基因组 DNA 来源的扩增就不能发生；当内含子较短时，基因组 DNA 来源的扩增可能发生，但基因组 DNA 来源的扩增产物比 mRNA 来源的扩增产物长，可通过分析融解曲线的方法加以区分。但是，此种方法不适合具有单个外显子的基因、或者不具有内含子的生物种以及基因组情报没被解析的生物种等，此时必须采取 2、的方法解决。

2、使用 DNase I 处理除去基因组 DNA

使用常规方法提取 Total RNA 后，再使用 DNase I（RNase-free）（Code No. 2270A）分解混入的基因组 DNA，最后进行苯酚/氯仿抽提、乙醇沉淀等纯化 Total RNA。

◆ 操作流程

① 按下列组分配制反应液

试剂	使用量
Total RNA	20-50 μg
10X DNase I Buffer	5 μl
RNase Inhibitor	20 U
DNase I (RNase-free)	2 μl (10 U)
DEPC 处理水	up to 50 μl

② 37℃ 20 min

③ 使用以下两种方法使 DNase I 失活

A. 热处理

（1）加入 2.5 μl 0.5 M EDTA 80℃ 2 min。

（2）用 DEPC 处理水定容至 100 μl。

B. 苯酚/氯仿抽提

- (1) 用 50 μ l DEPC 处理水定容至 100 μ l 后加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 混匀。
- (2) 室温, 15,000 rpm 5 min 离心, 取上清。
- (3) 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1) 混匀。
- (4) 室温, 15,000 rpm 5 min 离心, 取上清。
- ④ 加入 10 μ l 3 M 醋酸钠, 250 μ l 冷乙醇, 冰上放置 10 min。
- ⑤ 4°C, 15,000 rpm 15 min 离心, 弃上清。
- ⑥ 加入 70%冷乙醇洗净, 4°C, 15,000 rpm 5 min 离心, 弃上清。
- ⑦ 沉淀干燥。
- ⑧ 加入适量 DEPC 处理水溶解。

【基因组 DNA 确认方法】

不进行反转录反应, 通过 Real Time PCR 确认基因组 DNA 混入量。此实验使用从基因组 DNA 和 mRNA 中都能进行扩增的 Primer。DNase I 处理后的基因组 DNA 处理情况也可以通过此方法进行确认。另外, 使用跨内含子对基因组 DNA 不能进行扩增的 Primer 也有扩增产物时, 怀疑有伪基因存在, 这种情况也可以用此方法进行确认。

● 关联产品

- PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036Q/A/B)
- PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code No. RR047Q/A/B)
- TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B)
- TB Green® Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B)
- TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420Q/A/B)
- TB Green® *Premix DimerEraser*™ (Perfect Real Time) (Code No. RR091Q/A/B)
- Probe qPCR Mix (Code No. RR391S/A/B)
- EASY Dilution (for Real Time PCR) (Code No. 9160/9160Q)
- RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)
- Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)

TaKaRa Ex Taq and TB Green are registered trademarks of Takara Bio Inc.

PrimeScript, Thermal Cycler Dice, *Premix Ex Taq*, and *DimerEraser* 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>