

Code No. RR037Q

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×20 次)

1. 5X PrimeScript Buffer (for Real Time) *1	40 μl
2. PrimeScript RT Enzyme Mix I*2	10 μl
3. Oligo dT Primer (50 μM)	10 μl
4. Random 6 mers (100 μM)	40 μl
5. RNase Free dH <sub>2</sub> O	100 μl
6. EASY Dilution (for Real Time PCR) *3	100 μl

\*1 含有 dNTP Mixture 和 Mg<sup>2+</sup>。

\*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定量的标准曲线。

## ● 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 dH<sub>2</sub>O、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 $\mu$ l	1X
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 $\mu$ l	
Oligo dT Primer (50 $\mu$ M) *1	0.5 $\mu$ l	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M) *1	0.5 $\mu$ l	50 pmol
Total RNA		
RNase Free dH <sub>2</sub> O	up to 10 $\mu$ 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 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	50 pmol
Gene specific primer (2 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	1 pmol

\*2 反应体系可按需求相应放大，10  $\mu$ 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 $\mu$ l	1X
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 $\mu$ l	
Oligo dT Primer (50 $\mu$ M) *1	0.5 $\mu$ l	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M) *1	2 $\mu$ l	200 pmol
Total RNA		
RNase Free dH <sub>2</sub> O	up to 10 $\mu$ 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 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M)	2 $\mu$ l	200 pmol
Gene specific primer (2 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	1 pmol

\*2 反应体系可按需求相应放大, 10  $\mu$ l 反应体系可最大使用 1  $\mu$ 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  $\mu$ 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 Taq*II (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 Taq</i> II(Tli RNaseH Plus) (2X)	12.5 $\mu$ l	1X
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M*1
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M*1
RT 反应液 (cDNA 溶液) *2	2 $\mu$ l	
灭菌水	8.5 $\mu$ l	
Total	25 $\mu$ l*3	

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

\*2 建议在 25  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $T_m$  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：

本制品中使用的 *TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> 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 <i>Premix Ex Taq</i> II (Tli RNaseH Plus) (2X)	10 $\mu$ l	25 $\mu$ l	1X
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M) *1	0.8 $\mu$ l	2 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M*1
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M) *1	0.8 $\mu$ l	2 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M*1
ROX Reference Dye or Dye II (50X) *2	0.4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1X
RT 反应液 (cDNA 溶液) *3	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l	
灭菌水	6 $\mu$ l	16 $\mu$ l	
Total	20 $\mu$ l*4	50 $\mu$ l*4	

\*1 通常引物终浓度为 0.4  $\mu$ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.2~1.0  $\mu$ M 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)。

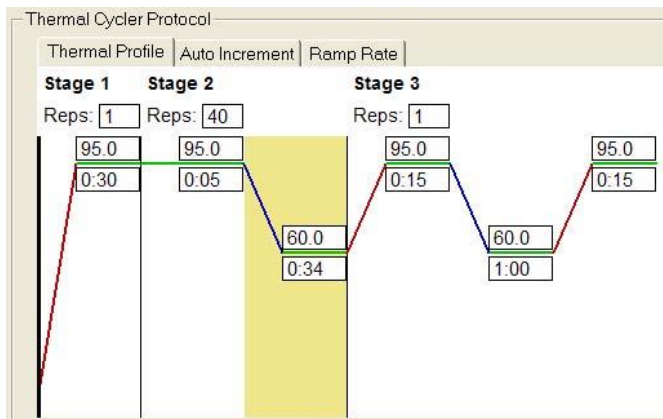
\*3 建议在 20  $\mu$ l 反应液中使用相当于 10 pg~100 ng Total RNA 量的 cDNA 为模板。反转录反应液的加入量不能超过 PCR 反应液总体积的 10%。

\*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  $T_m$  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

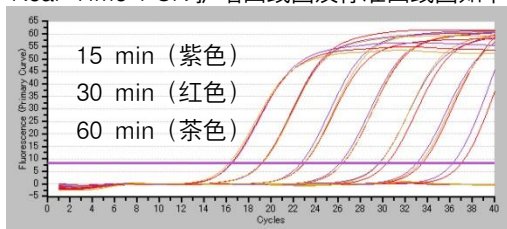
试剂: PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)  
模板: Mouse Liver Total RNA (2 pg~2 μg 和灭菌水)  
反应体积: 20 μl  
RT-Primer: Random 6 mers  
反应条件: 37°C 15、30、60 min 反应后 85°C 5 sec, 4°C 保存。

#### 2. Real Time PCR 反应

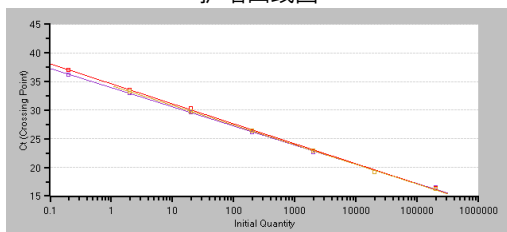
试剂: TB Green Premix Ex Taq (Perfect Real Time)  
模板: 上述反转录反应液 2 μl  
反应体积: 25 μl  
Target Gene: *Actb*  
反应条件: Thermal Cycler Dice Real Time System 标准反应条件

#### 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 RNeasy 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 $\mu\text{g}$
10X DNase I Buffer	5 $\mu\text{l}$
RNase Inhibitor	20 U
DNase I (RNase-free)	2 $\mu\text{l}$ (10 U)
DEPC 处理水	up to 50 $\mu\text{l}$

#### 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  $\mu\text{l}$  0.5 M EDTA 80℃ 2 min。

（2）用 DEPC 处理水定容至 100  $\mu\text{l}$ 。

## B. 苯酚/氯仿抽提

- (1) 用 50  $\mu$ l DEPC 处理水定容至 100  $\mu$ 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  $\mu$ l 3 M 醋酸钠, 250  $\mu$ 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](http://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>

v202204Da