

Code No. RR066A

研究用

---

**TaKaRa**

One Step TB Green<sup>®</sup>  
PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR Kit  
(Perfect Real Time)

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 试剂盒原理	1
● 制品内容	2
● 保 存	3
● 特 长	3
● 使用注意	3
● 操作方法	3
● 实验条件的选择	7
● 实验例	8
● 附 录	9
● 引物设计说明	10
● 关联产品	10

## ● 制品说明

本制品是采用 TB Green 嵌合荧光法进行 One Step RT-PCR 反应的专用试剂。使用本制品进行 Real Time RT-PCR 反应可在同一反应管内连续进行，操作简单，并能有效防止污染。本反应体系由于可以对扩增产物进行实时检测，大大提高了检测灵敏度，并省略了 PCR 反应后的电泳步骤，非常适合于 RNA 病毒等微量 RNA 的检测。

本制品中使用了适合于 Real Time RT-PCR 的反转录酶 PrimeScript RTase 和具有高扩增效率和高扩增特异性的 *TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> HS，能进行稳定的 Real Time One Step RT-PCR 反应。

### 适用的 Real Time PCR 扩增仪

Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)

Thermal Cycler Dice Real Time System II (Code No. TP900/TP960: 终卖)

Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (Code No. TP700/TP760: 终卖)

Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

Smart Cycler System/Smart Cycler II System (Cepheid)

LightCycler (Roche Diagnostics)

## ● 试剂盒原理

本制品首先使用反转录酶 PrimeScript RTase 将 RNA 反转录成 cDNA，再以 cDNA 为模板使用 *TaKaRa Ex Taq* HS 在同一反应管内连续进行 Real Time PCR 扩增反应（使用 TB Green 嵌合荧光法）。

### 1. PCR

PCR 法是以微量 DNA 进行目的片段扩增的方法。通过 DNA 链的热变性、引物退火、DNA 聚合酶作用下引物的延伸三个步骤循环往复，可在短时间内扩增 DNA 达 100 万倍以上。

本制品中的 DNA 聚合酶由于使用了改良后的 *TaKaRa Ex Taq* HS，从而抑制在调制反应液等低温条件下由引物产生的非特异性退火或引物二聚体引起的非特异性扩增，大大提高 PCR 扩增灵敏度。

### 2. RT-PCR

RNA 不能作为模板直接用于 PCR 的扩增，但是可以通过反转录酶以 RNA 为模板进行 PCR 反应合成的 cDNA 对 RNA 进行分析，即 RT-PCR 技术，可对 RNA 进行高质量检测。本试剂盒使用 One Step RT-PCR，实验原理如下：先使用特异性引物（反向）进行反转录扩增，再以合成的 cDNA 为模板，以特异性引物（正向、反向）进行 PCR 反应。（不能使用随机引物和 Oligo dT 引物进行反转录反应。）

原理请见图 1。

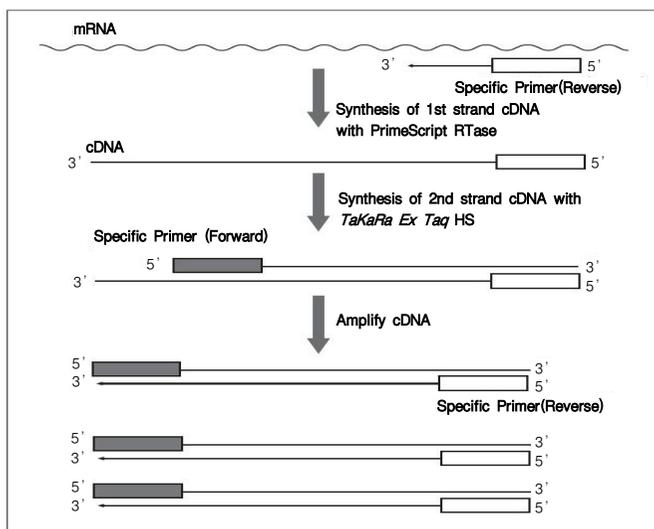


图 1. One Step RT-PCR 方法原理

### 3. 荧光检测法

[嵌合荧光法]

在反应体系中加入与双链 DNA 结合便可发出荧光的荧光染料 TB Green，通过检测 PCR 反应液中的荧光信号强度，可以对目的基因进行准确定量，同时还可以测定扩增目的 DNA 片段的融解温度。

原理请见图 2。

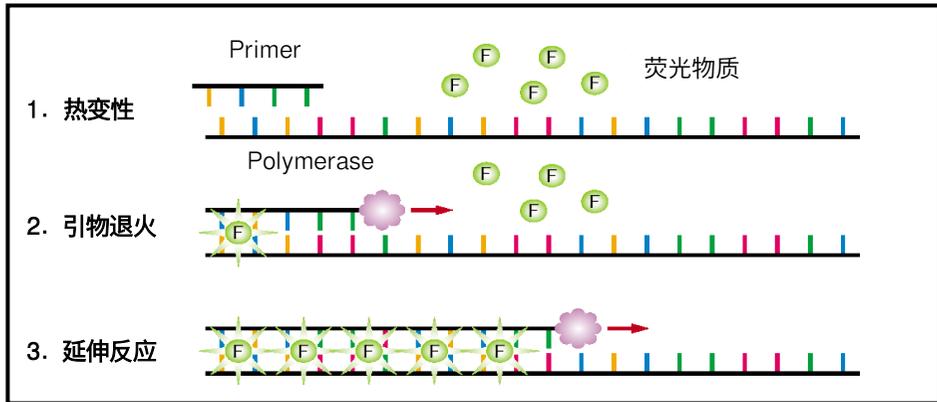


图 2.嵌合荧光法原理图

### ● 制品内容 (50 $\mu$ l 反应 $\times$ 100 次)

1. 2X One Step TB Green RT-PCR Buffer III *1	840 $\mu$ l $\times$ 3 支
2. TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ $\mu$ l)	100 $\mu$ l
3. PrimeScript RT enzyme Mix II *2	100 $\mu$ l
4. RNase Free dH <sub>2</sub> O	1.25 ml $\times$ 2 支
5. ROX Reference Dye *3 (50X)	100 $\mu$ l
6. ROX Reference Dye II *3 (50X)	100 $\mu$ l

\*1 内含 dNTP Mixture, Mg<sup>2+</sup>, TB Green, 避光保存。

\*2 内含 PrimeScript RTase 和 RNase Inhibitor。

\*3 ROX Reference Dye/Dye II 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

◆ 需要使用 ROX Reference Dye 校正的仪器

Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)  
StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆ 需要使用 ROX Reference Dye II 校正的仪器

Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆ 不需要校正的仪器

Thermal Cycler Dice Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)

Thermal Cycler Dice Real Time System III Lite (Code No. TP900/TP960/TP700/TP760: 终卖)

Smart Cycler System/Smart Cycler II System (Cepheid)

LightCycler (Roche Diagnostics)

#### 试剂盒外必备材料

1. Real Time PCR 基因扩增系统。
2. Real Time PCR 专用 tube 或平板。
3. PCR 引物\*。
4. 微量移液器和枪头 (高压灭菌)。

\* 参考“引物设计说明”部分。

● **保存：** -20°C。

2X One Step TB Green RT-PCR Buffer III 请于-20°C避光保存。

● **特 长**

1. 进行 Real Time One Step RT-PCR 反应，可以快速、准确地对 RNA 病毒等微量 RNA 进行分析。
2. PCR 用 DNA 聚合酶使用了 *TaKaRa Ex Taq* HS，可以进行 Hot Start 法 PCR 反应，再与 Takara 特别开发的 Buffer 系统相结合，具有高扩增效率，高扩增灵敏度之特点。2X One Step TB Green RT-PCR Buffer III 中预先混有 TB Green，反应液配制十分简单方便。

● **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 Real Time One Step RT-PCR 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、各种酶等)，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样品之间产生的误差。
- 2) 使用 *TaKaRa Ex Taq* HS、PrimeScript RT enzyme Mix II 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 One Step TB Green RT-PCR Buffer III 融解后如有不溶物请充分混合。
- 4) 反应液的配制、分装请一定使用新的（无污染的）枪头、Microtube 等，尽量避免污染。
- 5) 本制品只能使用特异性反转录引物，不能使用 Random Primer 和 Oligo dT Primer 等进行反转录反应。

● **操作方法**

**A) 应用 Thermal Cycler Dice Real Time System III (//和 Lite：终卖) 的操作方法**

按下列组分配制 RT-PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	使用量	终浓度
2X One Step TB Green RT-PCR Buffer III	12.5 μl	1X
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/μl)	0.5 μl	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.5 μl	
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM <sup>*1</sup>
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM <sup>*1</sup>
Total RNA <sup>*2</sup>	2 μl	
RNase Free dH <sub>2</sub> O	8.5 μl	
Total	25 μl	

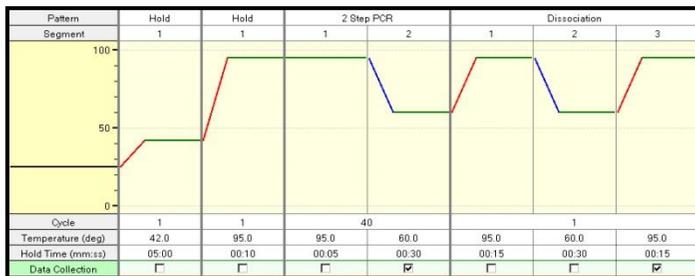
\*1 通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μM 范围内调整引物浓度。

\*2 建议在反应液中使用 10 pg~100 ng 的 Total RNA 为模板。

2. 进行 Real Time One Step RT-PCR 反应。

PCR 反应管用离心机轻轻离心后放入 Thermal Cycler Dice Real Time System 中进行 Real Time PCR 反应。

建议采用下列图表显示的标准 PCR 反应程序，如果使用该程序得不到良好的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化。使用 T<sub>m</sub> 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。有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件说明」。



Pattern 1: 反转录反应

Hold

42°C 5 min

95°C 10 sec

Pattern 2: PCR 反应

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 30 sec

Pattern 3: Dissociation

◆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 用高效 DNA 聚合酶, 与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比, 不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的预变性, 只需 10 秒钟即可。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。PCR 反应前的反转录酶的热变性失活通常设定为 95°C、10 sec。

3. 实验结果分析。

反应结束后确认 Real Time One Step RT-PCR 的扩增曲线和融解曲线, 进行 RT-PCR 定量时制作标准曲线等。参见 Thermal Cycler Dice Real Time System 操作手册和“实验例”中 Thermal Cycler Dice Real Time System 的分析方法。

B) 应用 Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System 的操作方法

注意: 请按照各仪器的操作手册进行实验操作。

1) 按下列组分配制 RT-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
2X One Step TB Green RT-PCR Buffer III	10 $\mu$ l	25 $\mu$ l	1X
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/ $\mu$ l)	0.4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M <sup>*1</sup>
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M <sup>*1</sup>
ROX Reference Dye or Dye II (50X) <sup>*3</sup>	0.4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	
Total RNA	2 $\mu$ l	4 $\mu$ l <sup>*2</sup>	<sup>*2</sup>
RNase Free dH <sub>2</sub> O	6 $\mu$ l	16 $\mu$ l	
Total	20 $\mu$ l <sup>*4</sup>	50 $\mu$ l <sup>*4</sup>	

\*1 通常引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在 0.1~1.0  $\mu$ M 范围内调整引物浓度。

\*2 建议在 50  $\mu$ l 反应液中使用 20 pg~200 ng 的 Total RNA 为模板。

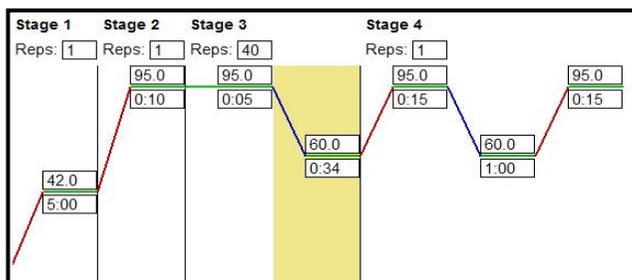
\*3 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR System 使用 ROX Reference Dye (50X), Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System 使用 ROX Reference Dye II (50X)。

\*4 按不同仪器的要求确定反应体系的体积。

2) 进行 Real Time One Step RT-PCR 反应。

建议采用下列图表显示的 PCR 反应程序，如果使用该程序得不到良好的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化。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。有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件」。

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



Stage 1、2: 反转录反应

Reps: 1

42°C 5 min

95°C 10 sec

Stage 3: PCR 反应

Reps: 40

95°C 5 sec

60°C 30~34 sec\*5

Stage 4: Dissociation Protocol

\*5 使用 StepOnePlus 时请设定为 30 秒；使用 7300 时请设定为 31 秒；使用 7500 时请设定为 34 秒。

<Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System>

Holding Stage

42°C 5 min

95°C 10 sec

Cycling Stage

Number of Cycles: 40

95°C 3 sec

60°C 30 sec

Melt Curve 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，与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比，不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。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。PCR 反应前的反转录酶的热变性失活通常设定为 95°C、10 sec。

3) 实验结果分析。

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

分析方法参见仪器的操作手册。

### C) 应用 LightCycler 的操作方法

**注意：**请按照 LightCycler (Roche Diagnostics) 的使用说明书要求进行实验操作。

1) 按下列组分配制 RT-PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

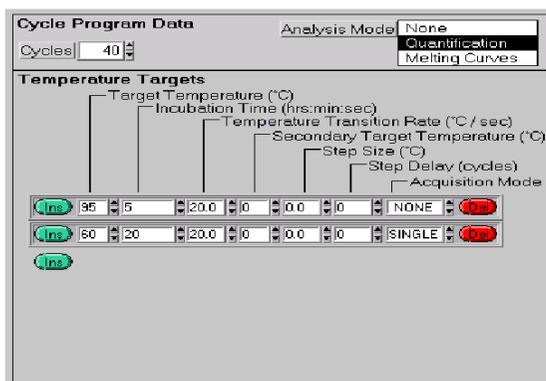
试剂	使用量	终浓度
2X One Step TB Green RT-PCR Buffer III	10 $\mu$ l	1X
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/ $\mu$ l)	0.4 $\mu$ l	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.4 $\mu$ l	
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M*1
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M*1
Total RNA*2	2 $\mu$ l	
RNase Free dH <sub>2</sub> O	6.4 $\mu$ l	
Total	20 $\mu$ l	

\*1 通常引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 可以得到较好结果。反应性能较差时,可以在 0.1~1.0  $\mu$ M 范围内调整引物浓度。

\*2 建议使用 10 pg~100 ng 的 Total RNA 为模板。

2) 进行 Real Time One Step RT-PCR 反应。

PCR 反应用毛细管请用离心机轻轻离心后放入 LightCycler 中进行 Real Time PCR 反应。建议采用下列图表显示的 PCR 反应程序,如果使用该程序得不到良好的实验结果时,再进行 PCR 条件的优化。使用 T<sub>m</sub> 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。有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件」。



Stage 1: 反转录反应

42°C 5 min 20°C/sec

95°C 10 sec 20°C/sec

1 Cycle

Stage 2: PCR 反应

95°C 5 sec 20°C/sec

60°C 20 sec 20°C/sec

40 Cycles

Stage 3: 融解曲线分析

95°C 0 sec 20°C/sec

65°C 15 sec 20°C/sec

95°C 0 sec 0.1°C/sec

#### ◆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,与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比,不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。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。PCR 反应前的反转录酶的热变性失活通常设定为 95°C、10 sec。

3) 实验结果分析。

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

## D) 应用 Smart Cyclor II System 的操作方法

1) 按下列组分配制 RT-PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

试剂	使用量	终浓度
2X One Step TB Green RT-PCR Buffer III	12.5 $\mu$ l	1X
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.5 $\mu$ l	
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M*1
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M*1
Total RNA*2	2 $\mu$ l	
RNase Free dH <sub>2</sub> O	8.5 $\mu$ l	
Total	25 $\mu$ l	

\*1 通常引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 可以得到较好结果。反应性能较差时,可以在 0.1~1.0  $\mu$ M 范围内调整引物浓度。

\*2 建议使用 10 pg~100 ng 的 Total RNA 为模板。

2) 进行 Real Time One Step RT-PCR 反应。

PCR 反应管用离心机轻轻离心后放入 Smart Cyclor System 中进行 Real Time PCR 反应。建议采用下列图表显示的 PCR 反应程序,如果使用该程序得不到良好的实验结果时,再进行 PCR 条件的优化。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。有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件」。

Stage 1					Stage 2					Stage 3				
Repeat 1 times.					Repeat 40 times.					Melt Curve				
2-Temperature Cycle					2-Temperature Cycle									
Deg/Sec	Temp	Secs	Optics		Deg/Sec	Temp	Secs	Optics		Start	End	Optics	Deg/Sec	
NA	42.0	300	Off		NA	95.0	5	Off		60.0	95.0	Ch1	0.2	
NA	95.0	10	Off		NA	60.0	20	On						
<input type="checkbox"/> Advance to Next Stage					<input type="checkbox"/> Advance to Next Stage									

Stage 1: 反转录反应

Hold

42°C 5 min

95°C 10 sec

Stage 2: PCR 反应

Repeat: 40 times

95°C 5 sec

60°C 20 sec

Stage 3: Melt Curve

### ◆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,与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比,不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。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。PCR 反应前的反转录酶的热变性失活通常设定为 95°C、10 sec。

3) 实验结果分析。

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

分析方法参见仪器的操作手册以及实验例。

### ● 实验条件的选择

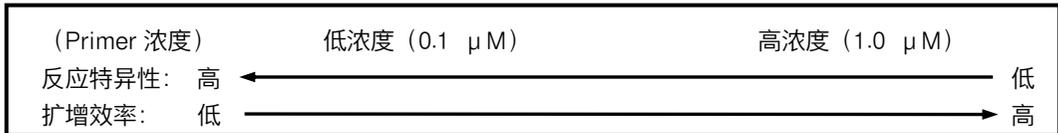
如果按照推荐的两步法条件进行反应,反应性能不好时,请按照下面的方法进行引物和 PCR 反应条件的研讨。实验条件选择时,请从反应特异性与扩增效率两方面进行综合考虑。要求能同时满足这两个条件的反应体系,才可以在较大浓度范围内进行很好的定量。

○ 反应特异性高的实验体系应具备以下条件:

- No Template Control 时不产生引物二聚体等非特异性扩增。
- 不产生目的片段以外的扩增。
- 扩增效率高的实验体系应具备以下条件：
  - 扩增产物起峰更早 (Ct 值小)。
  - PCR 扩增效率高 (接近理论值 100%)。

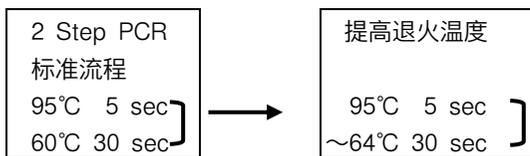
### 1. Primer 浓度与反应性能间的关系如下：

降低 Primer 浓度有助于提高特异性；提高 Primer 浓度有助于提高扩增效率。图示如下：

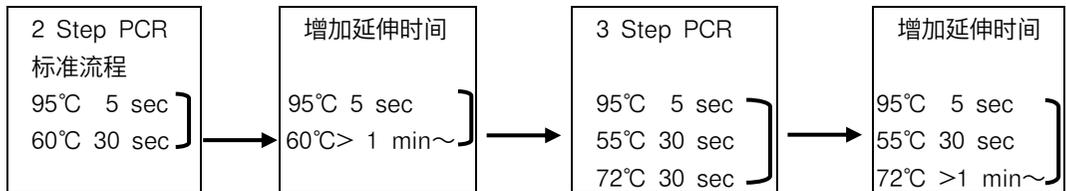


### 2. PCR 条件与反应性能间的关系如下：

① 要提高反应特异性，可以提高退火温度。



② 要提高扩增效率，可以增加延伸时间或变为 3 Step PCR 反应。



## ● 实验例

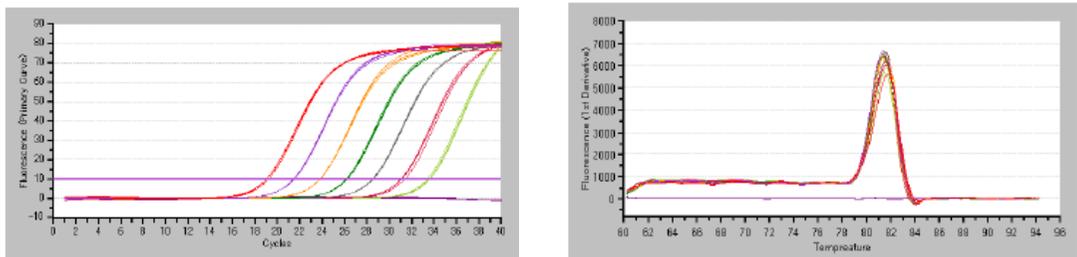
Rat Rplp2 (ribosomal protein, large P2) 基因的检测 (使用 Thermal Cycler Dice Real Time System)。

### 1. RT-PCR 方法。

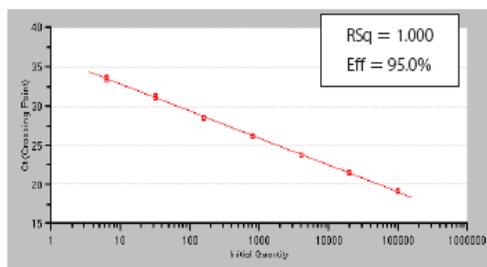
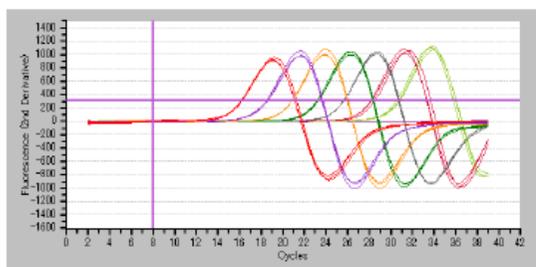
从大鼠肝脏中提取的 Total RNA 6.4 pg~100 ng 为模板，灭菌水作为阴性对照进行 Real Time One Step RT-PCR 反应。

### 2. RT-PCR 扩增结果。

Real Time One Step RT-PCR 的反应结果如下：



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。



### 3. 结果分析。

本实验检测到了 6.4 pg~100 ng Total RNA 中的目的基因。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。同时定量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。

## ● 附录

### RNA 样品制备

本试剂盒是将 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) 干热灭菌 (180°C, 60 min)。
- (2) 用 0.1% DEPC 水溶液在 37°C 下处理 12 小时，然后在 120°C 下高压灭菌 30 分钟以除去残留的 DEPC。

**注意：**RNA 实验用的器具建议专门使用，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)，使用的灭菌水须用 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】

由于 RT-PCR 反应通常只需要少量 RNA，因此一般的纯化方法都可以满足。但建议使用 GTC 法 (异硫氰酸胍法) 制备的高纯度 RNA。总体说来，RNA 的纯度越高越好。当从培养细胞和组织样品中提取高纯度的 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)。

## ● 引物设计说明

进行 Real Time PCR 反应时, 设计反应性能良好的 PCR 引物非常重要。根据以下原则, 可以设计出 PCR 扩增效率高, 反应特异性强的良好引物。

◆ PCR 扩增产物长度: 80~150 bp 适宜 (可以延长至 300 bp)。

◆ 设计引物要求如下:

引物长度	17~25 mers
GC 含量	40~60% (45~55%理想)
Tm 值	Forward Primer 和 Reverse Primer 的 Tm 值不能相差太大。 Tm 值的计算使用专用软件。 OLIGO*1: 63~68°C Primer3: 60~65°C
引物序列	A、G、C、T 整体分布尽量均匀。 不要有部分的 GC rich 或 AT rich (特别是 3' 端)。 避开 T/C (Polypyrimidine) 或 A/G (Polypurine) 的连续结构。
3' 末端序列	避免 GC rich 或 AT rich。 3' 末端碱基最好为 G 或 C。 尽量避免 3' 末端碱基为 T。
互补序列	避开引物内部或两条引物之间有 3 个碱基以上的互补序列。 两条引物间的 3' 末端避开有 2 个碱基以上的互补序列。
特异性	使用 BLAST*2 检索确认引物的特异性。

\*1 OLIGO Primer Analysis Software。 (Molecular Biology Insights, Inc.)

\*2 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

**特别提示: 本公司提供用于基因表达定量分析的引物探针设计合成服务和引物探针设计合成验证一条龙服务。**

本公司以美国 NCBI Data Base 上登录的 Human、Mouse、Rat、Cow、Dog、Chicken 的 RefSeq 为对象, 已经设计完成了各基因用于定量表达分析的 Real Time RT-PCR 用高特异性 Primer Set, 此 Primer Set 适于本制品使用, 可省略 PCR 反应条件优化实验。

注) 本公司只对在本公司合成的引物/探针提供免费设计服务, 恕不受理不在本公司合成的引物/探针的设计委托!

## ● 关联产品

One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR096A/B)

One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (Code No. RR086A/B)

One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR064A/B)

TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420S/A/B)

TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820S/A/B)

TB Green® Premix Ex Taq DimerEraser™ (Perfect Real Time) (Code No. RR091A/B)

Probe qPCR Mix (Code No. RR391S/A/B)

Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)

RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

RNAiso Blood (Code No. 9112/9113)

TB Green and *TaKaRa Ex Taq* are registered trademarks of Takara Bio Inc.  
PrimeScript, Thermal Cycler Dice, DimerEraser, and *Premix Ex Taq* 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>

v202207Da