

Code No. RR092S
RR092A

研究用

TAKARA

PrimeScript™ FAST RT reagent Kit
with gDNA Eraser

说明书

目 录

| 内 容 | 页 码 |
|---------------------|-----|
| ● 制品说明 | 1 |
| ● 制品内容 | 1 |
| ● 试剂盒外必备材料 | 1 |
| ● 保 存 | 1 |
| ● 特 长 | 1 |
| ● 使用注意 | 2 |
| ● 操作方法 | 2 |
| ● 参考: Real Time PCR | 3 |
| ● 关联产品 | 4 |

● 制品说明

PrimeScript FAST RT reagent Kit with gDNA Eraser 是可以除去基因组 DNA 进行 Real Time RT-PCR 反应的专用反转录试剂。试剂盒中使用了具有较强 DNA 分解活性的 gDNA Eraser, 42°C, 2 min 即可除去基因组 DNA, 之后添加含有完全抑制 DNA 分解活性成分的反转录反应试剂, 进行 10 分钟的反转录反应。由于基因组去除试剂和反转录反应试剂预先进行了预混化, 因此, 通过向 RNA 样品中依次添加试剂的简便操作, 可以毫无损失地进行从基因组 DNA 去除到 cDNA 合成的反应。

本试剂盒尤其适用于存在基因组残留问题的 Real Time RT-PCR 分析, 例如无法设计合适引物的单外显子基因或没有大内含子的基因, 以及由于假基因的存在无法避免基因组来源的非特异性扩增时。

使用本制品合成的 cDNA 适用于嵌合荧光法和探针法 qPCR 分析。可以根据实验目的, 选择与 TB Green® Premix Ex Taq™ II FAST qPCR(Code No. CN830S/A)、TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B)、TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A/B)、Probe qPCR Mix (Code No. RR391S/A/B)、Probe qPCR Mix, with UNG (Code No. RR392S/A/B) 等定量 PCR 试剂组合使用。

● 制品内容 (RR092S: 20 µl 反应×40 次、RR092A: 20 µl 反应×100 次)

| | Code No. RR092S | RR092A |
|--|-----------------|----------|
| 1. 8X gDNA Eraser Premix*1 | 80 µl | 200 µl |
| 2. 5X RT Premix*2 | 160 µl | 400 µl |
| 3. RNase Free H ₂ O | 1 ml | 1 ml × 2 |
| 4. EASY Dilution II (for Real Time PCR) *3、4 | 1 ml | 1 ml |

*1: 8X gDNA Eraser Premix 成分是后续反转录反应所必需的, 请务必进行基因组 DNA 的除去反应。含有 RNase Inhibitor。

*2: 含有 dNTP mixture、Oligo dT Primer 和 Random 6 mers。

*3: 制作标准曲线时梯度稀释 total RNA 和 cDNA 的稀释液。如果用水或 TE Buffer 稀释, 往往不能准确地进行稀释, 但使用 EASY Dilution II (for Real Time PCR) 时, 即使稀释至低浓度也能够进行准确地稀释。请注意, 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。

*4: 可以单独购买 EASY Dilution II (for Real Time PCR) (Code No. 9451)

● 试剂盒外必备材料

热循环仪 (或 37°C 水浴, 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. 在短短 15 分钟内完成从去除基因组 DNA 到 cDNA 合成的反应。
2. 只需依次添加预混试剂的简便操作, 即可进行反应。
3. 通过单管反应可以从模板 RNA 中毫无损失地合成 cDNA。
4. Random 6 mers 和 Oligo dT Primer 作为反转录引物, 预先包含在 5X RT Premix 中, 可以均匀地合成 RNA 的全部区域。
5. 本制品中附加了标准曲线制作用稀释液 EASY Dilution II (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. 使用本制品合成的 cDNA 与 TB Green 关联制品组合使用时，建议使用以下 TB Green Premix 系列。与本制品组合使用，可以得到可信用度高的结果。
TB Green *Premix Ex Taq* II FAST qPCR (Code No. CN830S/A)
TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B)
TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420Q/A/B)
本制品与 TB Green Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B) 组合使用时，有时反应性能不好，不推荐使用。
2. 8X gDNA Eraser Premix 和 5X RT Premix 前在使用前需颠倒混匀，轻轻离心后使用。
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

1. 去除基因组 DNA 反应

按如下成分于冰上配制反应混合液，为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先按反应数 + α 的量配制 Master Mix，然后再分装到每个反应管中，最后加入 RNA 样品。

<每个反应>

| 试剂 | 使用量 |
|-----------------------------|------------|
| 8X gDNA Eraser Premix | 2 μ l |
| RNA 样本*1 | |
| RNase Free H ₂ O | |
| Total | 16 μ l |



42°C 2 min (或者室温 5 min*2)
4°C

- *1: 20 μ l 反转录反应体系中，TB Green qPCR 法最多可使用 1 μ g 的 Total RNA，探针 qPCR 分析法最多可使用 2 μ g 的 Total RNA。反转录反应也可以根据需求按比例放大。
*2: 室温反应时，可以延长至 30 分钟。

2. 反转录反应

在冰上向 1. 反应液中每次添加 4 μ l 5X RT Premix，轻柔混匀后立即进行反转录反应。

<1 个反应>

| 试剂 | 使用量 |
|--------------|------------|
| 步骤 1 的反应液 | 16 μ l |
| 5X RT Premix | 4 μ l |
| Total | 20 μ l |



37°C 10 min
85°C 5 sec
4°C*3

- *3: 合成的 cDNA 需要长期保存时，请于 -20°C 或更低温度保存。

注意: 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。

● 参考: Real Time PCR

以下是使用本制品进行反转录反应后, 选择 TB Green *Premix Ex Taq* II FAST qPCR(Code No. CN830S/A)进行 Real Time PCR 反应的操作方法。

※ 请按照各个装置的使用说明书进行操作。

1. 按下列组分配制 PCR 反应液。

<1 个反应>

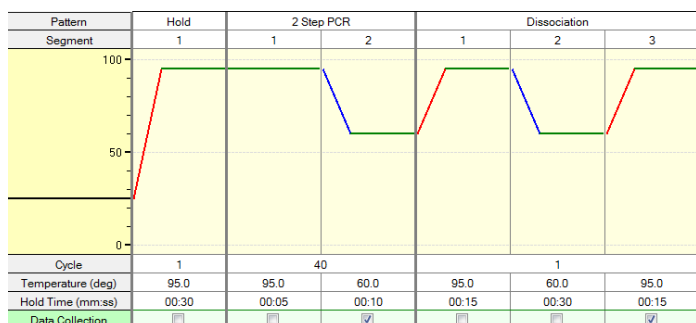
| 试剂 | 使用量 | 终浓度 |
|---|--------------------|---------------------------|
| TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II Fast qPCR (2X) | 12.5 μ l | 1X |
| PCR Forward Primer (10 μ M) | 1.0 μ l | 0.4 μ M ^{*1} |
| PCR Reverse Primer (10 μ M) | 1.0 μ l | 0.4 μ M ^{*1} |
| RT 反应液 (cDNA 溶液) ^{*2} | \leq 2.5 μ l | |
| 灭菌水 | X μ l | |
| Total | 25.0 μ l | |

*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 反转录反应液的加入量不能超过 PCR 反应液总体积的 10%。

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:

Hold: 预变性

Cycle: 1
95°C 30 秒

2 Step PCR 反应

Cycles: 40
95°C 5 秒
60°C 10 秒

Dissociation

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。

● 关联产品

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A/B)
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II Fast qPCR (Code No. CN830S/A)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420Q/A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) (Code No. RR071A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ DimerEraser™ (Perfect Real Time) (Code No. RR091A/B)
Probe qPCR Mix (Code No. RR391A/B)
Probe qPCR Mix, with UNG (Code No. RR392A/B)
EASY Dilution II (for Real Time PCR) (Code No. 9451)
Thermal Cycler Dice™ Real Time System IV (Code No. TP1000/TP1010/TP1030)
Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (Code No. 640231/640232)
NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250)
RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

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

Premix Ex Taq, PrimeScript, and Thermal Cycler Dice 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>