

Code No. RR036A

研究用

TaKaRa

PrimeScript™ RT Master Mix
(Perfect Real Time)

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
● Real Time PCR	2
● 实验例	5
● 附录	5
● 关联产品	7

● 制品说明

本制品是 2 Step Real Time RT-PCR 用的理想反转录反应试剂。5×PrimeScript RT Master Mix 中含有定量 RT-PCR 的反转录反应所需的所有试剂(PrimeScript RTase、RNase Inhibitor、Random 6 mers、Oligo dT Primer、dNTP Mixture、反应 Buffer)，加入模板 RNA 和水即可迅速进行反应。使用具有较强延伸能力的 PrimeScript RTase，与制品 PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037Q/A/B) 相同，可以在较短时间内高效合成 Real Time PCR 用模板 cDNA。

本制品合成的 cDNA 可以用于 SYBR[®] Green qPCR 分析法和探针分析法，可以根据实验目的与 SYBR *Premix Ex Taq*[™] II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B)、SYBR Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B) 和 Probe qPCR Mix (Code No. RR391S/A/B) 等定量试剂配合使用，能够进行高性能的基因表达分析。

注意：Takara Bio 使用 SYBR Green I 作为研究试剂已得到 Molecular Probes Inc. 的许可。

● 制品内容 (10 μl 反应×200 次)

1. 5×PrimeScript RT Master Mix (for Real Time) *1	400 μl
2. RNase Free dH ₂ O	1 ml × 2 支
3. EASY Dilution (for Real Time PCR) *2	1 ml

*1: 含有 PrimeScript RTase、RNase Inhibitor、Random 6 mers、Oligo dT Primer、dNTP Mixture、反应 Buffer (含有 Mg²⁺)。

*2: 制作标准曲线时梯度稀释 cDNA 或 RNA 标准品的稀释液。模板 DNA 或 RNA 如果用水或 TE Buffer 稀释时，由于受 Microtube 吸附作用等的影响，往往不能准确地进行稀释，导致实验结果准确度降低。使用本制品时，即使稀释至低浓度也能够进行准确地稀释，容易在宽广范围内获得准确量的标准曲线。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 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. 制品为预先混好的 Premix 形式，只需加入模板 RNA 和水便可以开始反应。
2. 可以在较短时间内高效合成 Real Time PCR 用 cDNA，是进行 2 Step Real Time RT-PCR 反应的理想试剂。
3. 使用了 Random 6 mers 和 Oligo dT Primer 2 种反转录引物，可以合成适合 Real Time PCR 用 cDNA。
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. 5×PrimeScript RT Master Mix 在使用前要小心地离心收集到反应管底部。由于 5×PrimeScript RT Master Mix 粘度高，用移液枪慢慢反复吸打充分混匀后使用。
2. 分装试剂时务必使用新的枪头 (Tip)，以防止样品间污染。
3. 本制品中已经加入了反转录 Primer (Oligo dT Primer 和 Random 6 mers)，如果要使用 Gene Specific Primer 进行反转录反应，则不能使用本制品。

● 操作方法

反转录反应

RNA 的制备方法参见“附录”。

1. 按下列组份配制 RT 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	使用量	终浓度
5×PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)	2 μ l	1 ×
Total RNA	*	
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μ l	

* 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. 轻柔混匀后进行反转录反应，条件如下：

37°C 15 min (反转录反应)

85°C 5 sec (反转录酶的失活反应)

4°C

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。

● Real Time PCR

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

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

*请按照仪器使用说明书要求进行实验操作。

1. 按下列组份配制 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
SYBR <i>Premix Ex Taq</i> II(Tli RNaseH Plus) (2×)	10 μ l	25 μ l	1 ×
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.8 μ l	2 μ l	0.4 μ M ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.8 μ l	2 μ l	0.4 μ M ^{*1}
ROX Reference Dye or Dye II (50×) ^{*2}	0.4 μ l	1	1 ×
RT 反应液 (cDNA 溶液) ^{*3}	2 μ l	4 μ l	
灭菌水	6 μ l	16 μ l	
Total	20 μ l ^{*4}	50 μ l ^{*4}	

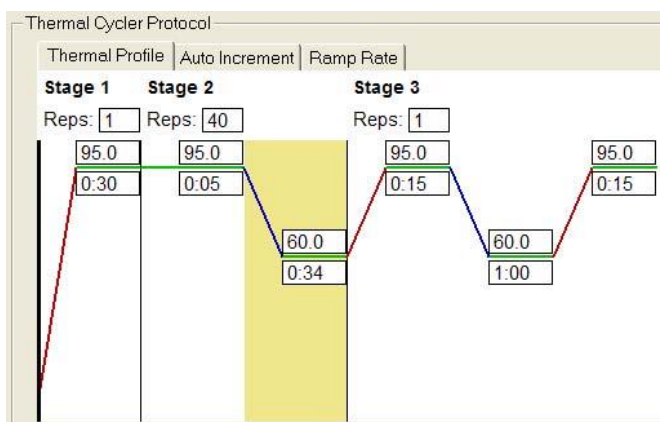
*1 通常引物终浓度为 0.4 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.2~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

- *2 ROX Reference Dye II (50×) 比 ROX Reference Dye (50×) 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 (50×)。使用 StepOnePlus Real-Time PCR System 和 7300 Real-Time PCR System 时, 请使用 ROX Reference Dye (50×)。
- *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 按不同仪器的要求确定反应液的体积。

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 , 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

Reps: 1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Reps: 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。

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

1. 按下列组份配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	使用量	终浓度
SYBR Premix Ex TaqII(Tli RNaseH Plus) (2×)	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	1.0 μl	0.4 μM*1
PCR Reverse Primer (10 μM)	1.0 μl	0.4 μM*1
RT 反应液 (cDNA 溶液)	2 μl*2	
灭菌水	8.5 μl	
Total	25 μl	

*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 建议在 25 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%。

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

Repeat: 1
95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Repeat: 40
95°C 5 秒
60°C 30 秒

Stage 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 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。

● 实验例

反转录反应时间和 cDNA 合成量的研讨实验

[方法]

1. 反转录反应

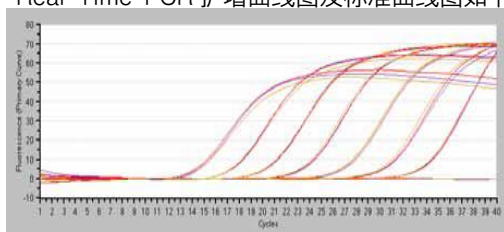
试剂: PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)
模板: Human Placenta Total RNA 2 pg~2 μg
反应体积: 20 μl
反应条件: 37°C 15、30、60 min 反应后 85°C 5 sec 热变性, 4°C 保存

2. Real Time PCR 反应

试剂: SYBR Premix Ex Taq II (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

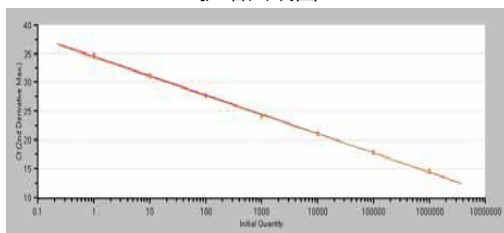
[结果]

Real Time PCR 扩增曲线图及标准曲线图如下:



扩增曲线图

15 min (紫色)
30 min (红色)
60 min (黄色)



标准曲线图

15 min (紫色) Rsq: 0.999 Eff=99% $Y = -3.346 \text{LOG}(X) + 34.52$

30 min (红色) Rsq: 1.000 Eff=98.9% $Y = -3.349 \text{LOG}(X) + 34.46$

60 min (黄色) Rsq: 0.999 Eff=100.9% $Y = -3.301 \text{LOG}(X) + 34.24$

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) 在宽广模板浓度范围内都可以得到同等的扩增效率。

● 附录

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 按下列组份配制反应液。

试剂	使用量
Total RNA	20~50 μg
10×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

SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B)
SYBR[®] Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B)
SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420Q/A/B)
Probe qPCR Mix (Code No. RR391S/A/B)
EASY Dilution (for Real Time PCR) (Code No. 9160/9160Q)
Thermal Cycler Dice[™] Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
Thermal Cycler Dice[™] Real Time System II (Code No. TP900/TP960)
Thermal Cycler Dice[™] Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760)
PrimeScript[™] RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037Q/A/B)
PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code No. RR047Q/A/B)
RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

TaKaRa Ex Taq is a registered trademarks of TAKARA BIO INC.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

PrimeScript、Thermal Cycler Dice、*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.takara-bio.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: <http://www.takara.com.cn>