

TaKaRa Code: DRR036A

**PrimeScript[®] RT Master Mix
Perfect Real Time
(200 次量)**

说明书

TaKaRa

宝生物工程(大连)有限公司

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 特 长	1
● RNA 样品制备	1
● 使用注意	3
● 操作方法	3
● 实验例：反转录反应时间和 cDNA 合成量的研讨实验	6
● 引物设计说明	7
● 引物设计服务说明	7

● 制品说明

本制品是 2 Step Real Time RT-PCR用的最佳反转录反应试剂。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，与以前制品PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR037) 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 分析法和 TaqMan 探针分析法，可以根据实验目的与 TaKaRa Code: DRR041/DRR081/DRR091/DRR071/DR075/DRR039 等试剂配合使用，能够进行高性能的基因表达分析。

● 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。

*2 制作标准曲线时梯度稀释 cDNA 或 RNA 标准品的稀释液。模板 cDNA 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，导致实验结果精度降低。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定量的标准曲线。EASY Dilution 也可以单独购买 (TaKaRa Code: D9160)。

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。

● 保 存： -20℃。

● 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 反应的最佳试剂。
3. 使用了 Random 6 mers 和 Oligo dT Primer 2 种反转录引物，可以合成最适的 Real Time PCR 用 cDNA。
4. 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。

● 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 (TaKaRa Code: D9108)。

【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, 超过 500 bp 就很难扩增了。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 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)
RNase Free dH ₂ O	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 RNase Free dH₂O 定容至 100 μl。

B. 苯酚/氯仿抽提

- (1) 用 50 μl RNase Free dH₂O 定容至 100 μl 后加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 混匀。
- (2) 室温, 13,500 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, 13,500 rpm 5 min 离心, 取上清。
- ④ 加入 10 μl 3 M 醋酸钠, 250 μl 冷乙醇, 冰上放置 10 min。
- ⑤ 4 $^{\circ}\text{C}$, 13,500 rpm 15 min 离心, 弃上清。
- ⑥ 加入 500 μl 70%冷乙醇洗净, 4 $^{\circ}\text{C}$, 13,500 rpm 5 min 离心, 弃上清。
- ⑦ 沉淀干燥。
- ⑧ 加入适量 RNase Free dH₂O 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。

●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 \times 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 \times 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),想使用 Gene Specific Primer 进行反转录反应时不能使用本制品。

●操作方法

1. 反转录反应。

- 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 \times PrimeScript [®] RT Master Mix (for Real Time)	2 μl	1 \times
Total RNA	*	
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μl	

* 反应体系可按需求相应放大, 10 μl 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 $^{\circ}\text{C}$ 15 min (反转录反应)
85 $^{\circ}\text{C}$ 5 sec (反转录酶的失活反应)
4 $^{\circ}\text{C}$

- ③ 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。

2. Real Time PCR 反应。

以下是使用本制品进行反转录反应后，选择SYBR® *Premix Ex Taq*TM II (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR081)进行Real Time PCR反应的操作方法。采用TaqMan®探针法进行检测时，请选择*Premix Ex Taq*TM (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR039)。

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

请按照Thermal Cycler Dice® Real Time System (TaKaRa Code: TP800) 的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)。

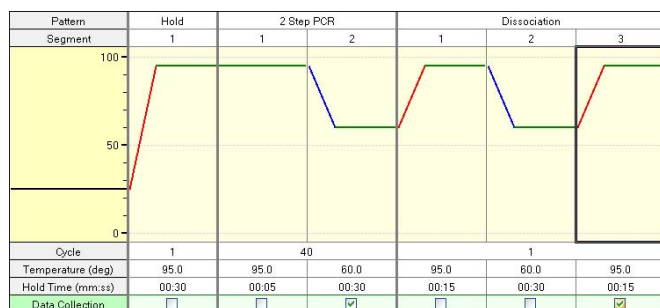
试剂	使用量	终浓度
SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> TM II (2×)	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	1.0 μl	0.4 μM*1
PCR Reverse Primer (10 μM)	1.0 μl	0.4 μM*1
RT 反应液 (cDNA 溶液)	2 μl*2	
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	8.5 μl	
Total	25 μl	

*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。退火/延伸时间可在 20~30 秒范围内进行调整，推荐使用 30 秒的条件。由于使用 T_m 值较低的引物等原因，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*

* 使用SYBR® Green I时进行。

◆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、定量精度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、30 秒。

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（使用SYBR® Green I时），进行PCR定量时制作标准曲线等。

◆应用ABI PRISM® 7000/7700/7900HT, 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System的操作方法

请按照 Applied Biosystems 公司的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）。

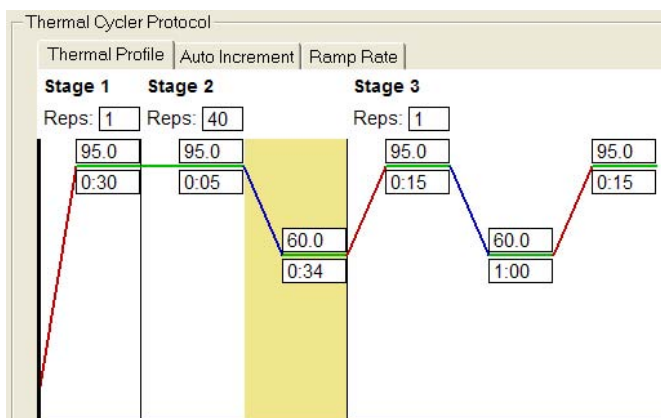
试剂	使用量	使用量	终浓度
SYBR® Premix Ex Taq™II (2×)	10 μl	25 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.8 μl	2 μl	0.4 μM*1
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8 μl	2 μl	0.4 μM*1
ROX Reference Dye or Dye II (50×) *3	0.4 μl	1 μl	1×
RT 反应液 (cDNA 溶液)	2 μl*2	4 μl	
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	6 μl	16 μl	
Total	20 μl*4	50 μl*4	

- *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 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%。
- *3 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×)，与使用 ROX Reference Dye (50×) 相比，校正后的荧光信号值高，但解析结果完全相同。使用 ABI PRISM 7000/7700/7900HT 及 7300 Real-Time PCR System 时，请使用 ROX Reference Dye (50×)。
- *4 96 孔板、Single-Tube、8 联 Tube 采用 50 μl 反应体系，384 孔板、96-well Fast Thermal Cycling plate 采用 20 μl 反应体系。

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。由于使用 Tm 值较低的引物等原因，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。

< ABI PRISM® 7000/7700/7900HT, 7300/7500 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 5 秒

60°C 30~34 秒*

Dissociation Stage

- * 使用 7700 和 7900HT 时请设定在 30 秒。
- 使用 7000 和 7300 时请设定在 31 秒。
- 使用 7500 时请设定在 34 秒。

◆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℃、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、定量精度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性, 通常设定为 95℃、30 秒。

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 (使用 SYBR® Green I 时), 进行 PCR 定量时制作标准曲线等。

●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。

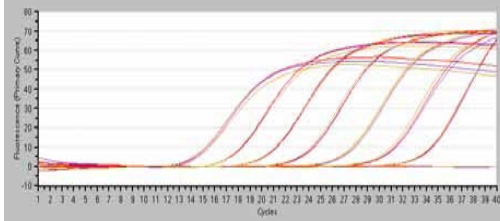
试剂: PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time)
模板: Human Placenta Total RNA 2 pg~2 µg
反应体积: 20 µl
反应条件: 37℃ 15、30、60 min 反应后 85℃ 5 sec 热变性, 4℃ 保存

2. Real Time PCR 反应。

试剂: SYBR® 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: Human Actb
Primer: 使用 TaKaRa 已设计完成的引物库中该基因的引物
反应条件: Thermal Cycler Dice® Real Time System 标准反应条件

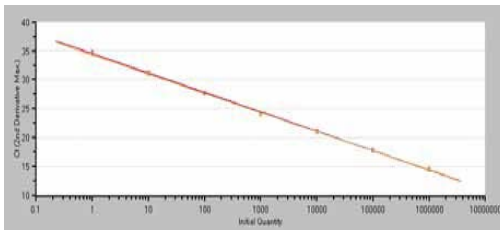
3. Real Time PCR 反应结果。

Real Time PCR 扩增曲线图及标准曲线图如下:



15 min (紫色)
30 min (红色)
60 min (茶色)

扩增曲线图



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 (茶色) 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。

●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 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 最为合适 (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%最佳)
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℃ Primer3 *2: 60 ~ 65℃
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' 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。二条引物间的 3' 末端避开有 2 个碱基以上的互补序列。
特异性	使用 BLAST *3 检索确认引物的特异性。

*1 OLIGO: Primer Analysis Software。

*2 Primer3: (<http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/software/>)

*3 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

●引物设计服务说明: 本公司提供用于基因表达定量分析的引物设计及合成服务

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 最适于本制品使用, 可省略 PCR 反应条件优化实验。具体情况如下:

可提供 1~3 对合适的引物, 由客户自己选择。

1. 从 3' 端开始的 1,500 Base 内的引物候补序列。
2. 从 5' 端开始的 1,500 Base 内的引物候补序列。
3. 针对 Target 基因全长的引物候补序列。

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!

MEMO

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
8008909508, 4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: service@takara.com.cn

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.04

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂