

Code No. RR047A

研究用

TaKaRa

PrimeScript™ RT reagent Kit
with gDNA Eraser
(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	2
● 使用注意	2
● 操作方法	2
● Real Time PCR	4
● 实验例	6
● 附 录	7
● 关联产品	8

● 制品说明

为了准确地进行基因表达量分析，必须满足只有 cDNA 作为模板检出的先决条件，但 Total RNA 中常常混有基因组 DNA，并可以直接作为 PCR 反应的模板进行扩增，因此会造成解析结果不准确。为了避免这种情况发生，通常将检测用引物设计在内含子前后的外显子上，使基因组 DNA 得不到扩增。但是，此方法不适合具有单个外显子的基因或两个外显子之间所跨的内含子过小的基因，同时当基因组上有伪基因存在时、或设计引物对基因组有非特异性扩增时、以及基因信息没被完全解析的生物种等也同样不适合于本方法。在这种情况下，我们常常需要对 Total RNA 样品进行 DNase I 处理，以除去残存的基因组 DNA。而 DNase I 处理通常要进行复杂的纯化操作，同时会造成 RNA 的降解和损失。

PrimeScript 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。Kit 中使用了具有较强 DNA 分解活性的 gDNA Eraser，通过 42℃，2 min 即可除去基因组 DNA。同时由于反转录试剂中含有抑制 DNA 分解酶活性的组分，经过 gDNA Eraser 处理后的样品可以直接进行 15 min 的反转录反应合成 cDNA，因此，20 min 内即可迅速完成从基因组 DNA 去除到 cDNA 合成的全过程。

使用本制品合成的 cDNA 适用于嵌合法和探针法 qPCR 分析，可以根据实验目的，选择与 TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (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) 组合使用。

● 制品内容 (20 μl 反应×100 次)

1. gDNA Eraser	100 μl
2. 5×gDNA Eraser Buffer* ¹	200 μl
3. PrimeScript RT Enzyme Mix I* ²	100 μl
4. 5×PrimeScript Buffer 2 (for Real Time) * ³	400 μl
5. RT Primer Mix* ⁴	400 μl
6. RNase Free dH ₂ O	1 ml × 2
7. EASY Dilution (for Real Time PCR) * ⁵	1 ml

*1: 5×gDNA Eraser Buffer 在反转录反应前使用，请务必进行基因组 DNA 的除去反应。

*2: 含有 RNase Inhibitor。

*3: 含有 dNTP Mixture。

*4: 含有 Oligo dT Primer 和 Random 6 mers。

*5: 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定量的标准曲线。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) (Code No. 9160/9160Q) 也可以单独购买。

注意：EASY Dilution (for Real Time PCR) 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℃水浴，42℃水浴和 85℃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℃。

● 特 长

1. 含有去除基因组 DNA 的 gDNA Eraser，只需 2 min 即可除去基因组 DNA。
2. 只需 15 min 即可高效合成 Real Time PCR 反应模板 cDNA，是进行 2 Step Real Time RT-PCR 反应的理想试剂。
3. 反转录引物使用了 Random 6 mers 和 Oligo dT Primer 混合的 RT Primer Mix，可以均匀合成样品中的各种 cDNA。
4. 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。

TB Green qPCR 分析法和探针 qPCR 分析法区别如下：

- 反转录反应中 RT Primer Mix 的用量。
- 反转录反应中总 RNA 的用量。

5. 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. 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：
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)
以上制品与本制品组合使用，可以得到可信用度高的结果。
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. 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 dH₂O、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。
3. gDNA Eraser 和 PrimeScript RT Enzyme Mix I 在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，而使酶量不足。
4. 5×gDNA Eraser Buffer 和 5×PrimeScript Buffer 2 (for Real Time) 在使用前需 Vortex 振荡混匀，轻轻离心后使用。
5. 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 +2 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。

试剂	使用量
5×gDNA Eraser Buffer	2.0 μl
gDNA Eraser	1.0 μl
Total RNA	*1
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μl



42°C 2 min (或者室温 5 min^{*2})

4°C

*1: 20 µl 反转录反应体系中, TB Green qPCR 法最多可使用 1 µg 的 Total RNA, 探针 qPCR 分析法 最多可使用 2 µg 的 Total RNA。

*2: 室温反应时, 可以延长至 30 分钟。

2. 反转录反应

反应液配制请在冰上进行。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+2 的量配制 Master Mix, 然后再分装 10 µl 到每个反应管中^{*3}。轻柔混匀后立即进行反转录反应。

<TB Green qPCR 法>

试剂	使用量
步骤 1 的反应液	10.0 µl
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0 µl
RT Primer Mix ^{*4}	1.0 µl
5×PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	4.0 µl
RNase Free dH ₂ O	4.0 µl
Total	20 µl ^{*5}

Master Mix
10 µl

37°C 15 min^{*6}

85°C 5 sec

4°C^{*7}

< 探针 qPCR 分析法>

试剂	使用量
步骤 1 的反应液	10.0 µl
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0 µl
RT Primer Mix ^{*4}	4.0 µl
5×PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	4.0 µl
RNase Free dH ₂ O	1.0 µl
Total	20 µl ^{*5}

Master Mix
10 µl

37°C 15 min^{*6}

85°C 5 sec

4°C^{*7}

*3: 若不配制 Master Mix, 向步骤 1 的反应液中添加试剂时, 要先加入 RNase Free dH₂O 和 5×PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)混合均匀, 以使 gDNA Eraser 的活性充分受到抑制, 再添加 RT Primer Mix、PrimeScript RT Enzyme Mix I, 轻轻混匀进行反转录反应。

*4: 使用 RT Primer Mix 可以高效合成 cDNA。因为实验目的不同, 也可以不使用 RT Primer Mix, 而选择 Oligo dT Primer 或 Gene Specific Primer 进行反转录反应, 引物使用量如下:

Oligo dT Primer 50 pmol / 20 µl 反应体系

Gene Specific Primer 5 pmol / 20 µl 反应体系

*5: 反转录体系可以根据需要相应扩大。

*6: 使用 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。

*7: 合成的 cDNA 需要长期保存时, 请于-20℃或更低温度保存。

- 注意:** 1) 在反转录反应中, TB Green qPCR 法的 RT Primer Mix 用量为 1 μ l, 探针 qPCR 分析法的用量为 4 μ l。
- 2) 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 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 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)。

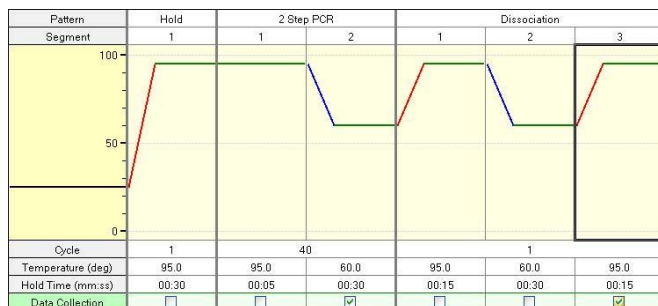
试剂	使用量	终浓度
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$)	12.5 μ l	1 $\times$
PCR Forward Primer (10 μ M)	1.0 μ l	0.4 μ M ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μ M)	1.0 μ l	0.4 μ M ^{*1}
RT 反应液 (cDNA 溶液)	2 μ l ^{*2}	
灭菌水	8.5 μ l	
Total	25 μ l	

*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 建议在 25 μ 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%。

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

Repeat: 1
95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Repeat: 40
95°C 5 秒
60°C 30-60 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。

◆ 应用 Applied Biosystems 7300/7500 Real Time PCR System 的操作方法

注意：按仪器使用说明书要求进行实验操作。

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 Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus) (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	
RT 反应液 (cDNA 溶液)	2 μl	4 μl	^{*2}
灭菌水	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。

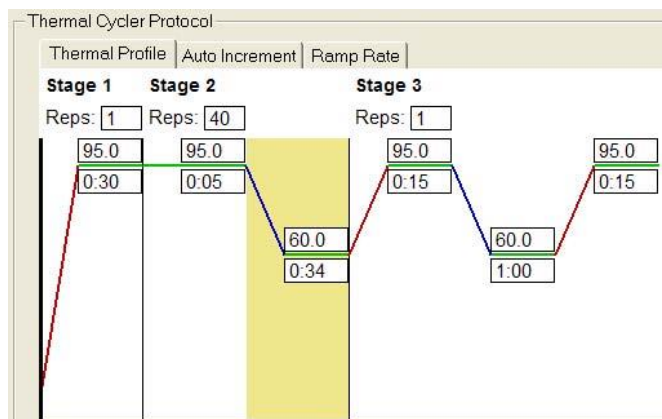
*2 建议在 20 μl 反应液中使用相当于 10 pg~100 ng Total RNA 量的 cDNA 为模板。反转录反应液的加入量不能超过 PCR 反应液总体积的 10%。

*3 ROX Reference Dye II (50×) 比 ROX Reference Dye (50×) 浓度低，使用 7500 Real Time PCR System 时，请使用 ROX Reference Dye II (50×)。使用 7300 Real Time PCR System 时，请使用 ROX Reference Dye (50×)。

*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。若使用 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

Reps: 1

95°C 30 秒

Stage 2：PCR 反应

Reps: 40

95°C 5 秒

60°C 31 或 34 秒*

Dissociation Stage

* 使用 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，如果在 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。

● 实验例

A. Total RNA 中混有基因组 DNA 的去除效果验证

[方法]

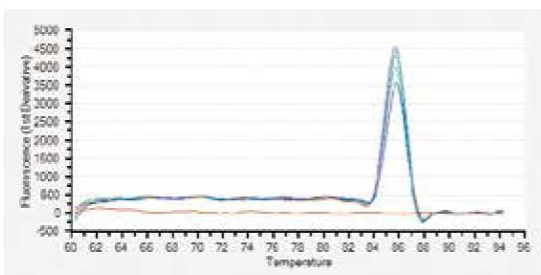
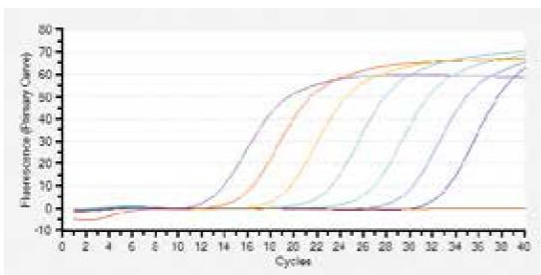
Total RNA 中混入一定量的基因组 DNA 作为模板, 使用本制品 (Code No. RR047A) 与 PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036A), 分别按照各自制品推荐的条件进行反转录反应后, 再进行 qPCR 反应, 对其结果进行比较。

模 板: HL60 细胞来源的 Total RNA
(0, 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 μ g)
+ Human genomic DNA 1 ng
qPCR: TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A)
qPCR 的模板: 反转录反应液各 2 μ l
目的基因: *RPLP1*
Primer: 利用 Perfect Real Time 系统设计 (内参大小: 129 bp)
qPCR 装置: Thermal Cycler Dice Real Time System // (Code No. TP900: 终卖)

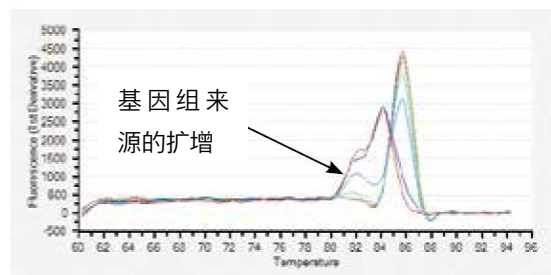
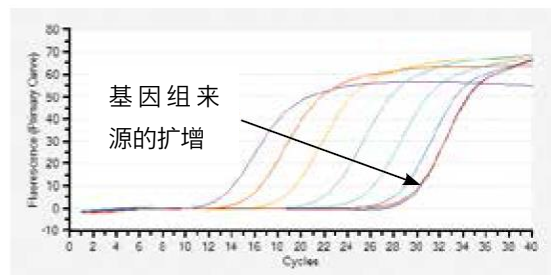
[结果]

即使含有基因组 DNA 的 Total RNA, 使用 RR047A 中含有的 gDNA Eraser 处理, 可以完全去除基因组 DNA, 只能得到 cDNA 来源的扩增产物。

RR047A



RR036A



B. cDNA 合成效率的比较

[方法]

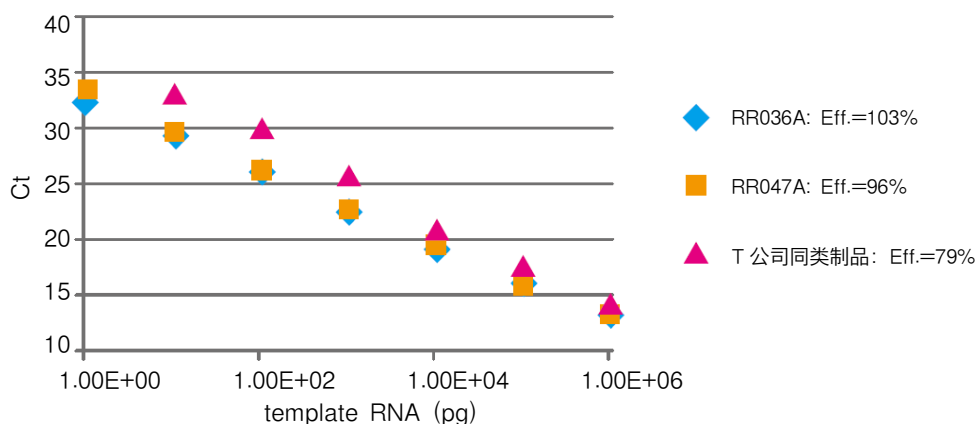
使用梯度稀释的 Total RNA 作为模板, 使用本制品 (Code No. RR047A)、T 公司同类型制品以及 PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036A), 分别按照各自制品推荐的条件进行反转录反应、qPCR 反应, 将结果进行比较。

模 板: HL60 细胞来源的 Total RNA
(0, 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 μ g)
qPCR: TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A)

qPCR 的模板: 反转录反应液各 2 μ l
 目的基因: *RPLP1*
 Primer: 利用 Perfect Real Time 系统设计
 qPCR 装置: Thermal Cycler Dice Real Time System // (Code No. TP900: 终卖)

[结果]

RR047A 的 cDNA 合成效率与不进行基因组 DNA 去除的 RR036A 的效率相当, 比 T 公司同类型制品的 cDNA 合成效率高。另外, RR047A 比 T 公司制品反应时间短。



	RR047	T公司同类制品
DNA去除反应	42℃ 2分钟	37℃ 5分钟
反转录反应	37℃ 15 分钟	37℃ 15 分钟
	85℃ 5 秒	50℃ 5 分钟
反应时间	约 17 分钟	约 30 分钟

Takara Bio Inc.比较结果

● 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 (Code No. 9108/9109)。纯化的RNA用灭菌水或灭菌的TE缓冲液溶解。

● 关联产品

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037Q/A/B)

PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036Q/A/B)

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)

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)

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>