

Code No. RR064A

研究用

TAKARA

One Step PrimeScript™
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
● 实验例	8
● 附 录	8
● 关联产品	9

● 制品说明

本制品是采用探针法进行 Real Time One Step RT-PCR 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监测，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* HS，能进行稳定高效的 Real Time One Step RT-PCR 反应。

适用的 Real Time PCR 扩增仪

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

LightCycler (Roche Diagnostics)

Smart Cycler System/Smart Cycler II System (Cepheid)

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)

● 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，对探针的荧光信号进行监测。

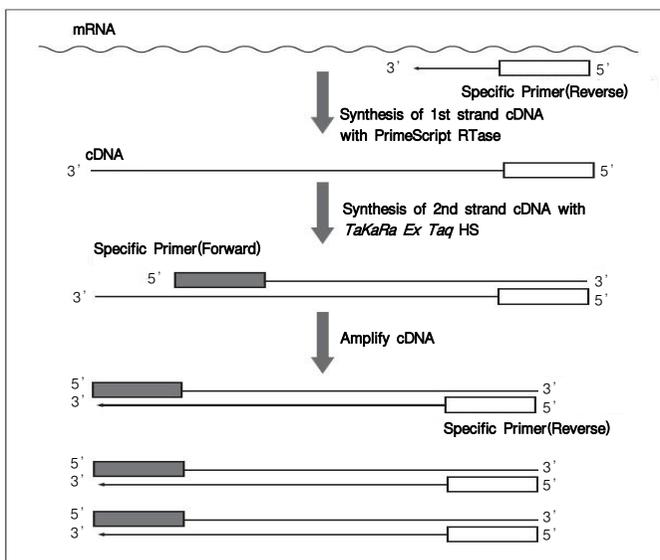
1. PCR

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。

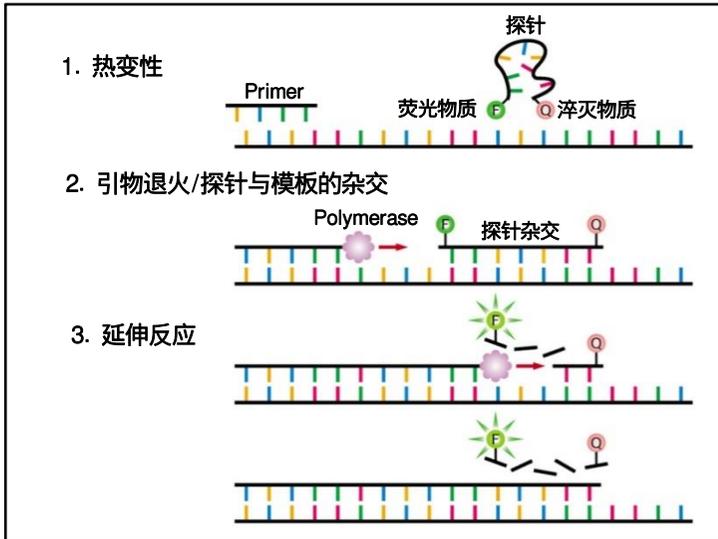


One Step RT-PCR 的原理

3. 荧光检测法

使用 5' 端带有荧光物质（如：FAM 等），3' 端带有淬灭物质（如：TAMRA 等）修饰的寡核苷酸进行荧光检测的方法。当探针完整时，5' 端的荧光物质受到 3' 端淬灭物质的制约，不能发出荧光。而当探针被分解后，5' 端的荧光物质便会游离出来，发出荧光。

当 PCR 反应液中加入荧光探针后，在 PCR 反应的退火过程中，荧光探针便会和模板杂交。进一步在 PCR 反应的延伸过程中，*Taq* DNA 聚合酶的 5' → 3' Exonuclease 活性可以分解与模板杂交的荧光探针，游离荧光物质发出荧光。通过检测反应体系中的荧光强度，可以达到检测 PCR 产物扩增量的目的。具体原理见下图。



● 制品内容 (50 μ l 反应 \times 100 次)

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

*1 内含 dNTP Mixture, Mg²⁺ 等。

*2 内含 RNase Inhibitor。

*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 使用 ROX Reference Dye (50X)，7500 Real-Time PCR System 使用 ROX Reference Dye II (50X)，Thermal Cycler Dice Real Time System 和 Smart Cycler System、LightCycler 等 Real Time PCR 扩增仪不必使用。

试剂盒外必备材料

Real Time PCR 扩增仪

Real Time PCR 专用的离心管或反应板

PCR 引物

检测用探针 (TaKaRa qPCR Probe, etc.)

微量移液器和枪头 (高压灭菌)

● **保存:** -20°C。

● **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。
3. One Step RT-PCR Buffer III 是一种 2X 浓度的 Premix Type 试剂, 操作简单, 能有效避免污染。

● **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 dH₂O、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 RT-PCR Buffer III 融解后如有不溶物请 vortex 充分混合。
配制 Real Time One Step RT-PCR 反应液时应避免强光照射。
- 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**

◆应用 LightCycler Real Time PCR 扩增仪的操作方法

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

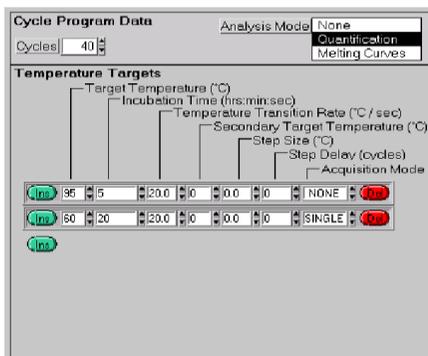
- 1) 按下列组分配制 RT-PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

试剂	使用量	终浓度
2X One Step RT-PCR Buffer III	10 μ l	1X
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/ μ l)	0.4 μ l	
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.4 μ l	
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M ^{*1}
Probe	0.8 μ l ^{*2}	
Total RNA	2 μ l ^{*3}	
RNase Free dH ₂ O	5.6 μ l	
Total	20 μ l	

- *1 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。
- *2 探针浓度与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关, 实际使用时请参照仪器说明书, 或各荧光探针的具体使用要求进行。
- *3 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_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 反应条件说明」。



标准操作方法

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

◆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，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。

◆ 应用 Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR 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	使用量	终浓度
2X One Step RT-PCR Buffer III	10 μ l	25 μ l	1X
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/ μ l)	0.4 μ l	1 μ l	
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.4 μ l	1 μ l	
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l	1 μ l	0.2 μ M ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l	1 μ l	0.2 μ M ^{*1}
Probe	0.8 μ l	2 μ l ^{*2}	
ROX Reference Dye or Dye II (50X) ^{*3}	0.4 μ l	1 μ l	
Total RNA	2 μ l	4 μ l ^{*4}	
RNase Free dH ₂ O	5.2 μ l	14 μ l	
Total	20 μ l ^{*5}	50 μ l ^{*5}	

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

*2 探针浓度与所使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行。

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

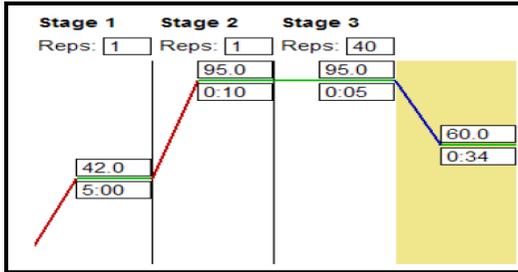
Reference Dye (50X)。

*4 建议在 50 μ l 反应液中使用 20 pg~200 ng 的 Total RNA 为模板。

*5 根据仪器推荐反应体系进行调整。

2) 进行 Real Time One Step RT-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_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 反应条件说明」。



标准操作方法

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 31 或 34 sec*

*使用 7300 时请设定为 31 秒；使用 7500 时请设定为 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°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，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。

◆应用 Smart Cycler II System Real Time PCR 扩增仪的操作方法

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 RT-PCR Buffer III	12.5 μ l	1X
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/ μ l)	0.5 μ l	
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.5 μ l	
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M* ¹
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M* ¹
Probe	1 μ l* ²	
Total RNA	2 μ l* ³	
RNase Free dH ₂ O	7.5 μ l	
Total	25 μ l	

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

*2 探针浓度与所使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，使用时请参考仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行。使用 Smart Cycler System 时，通常探针终浓度在 0.1~0.5 μ M 范围内进行调整。

*3 建议使用 total RNA 模板的量为 10 pg-100 ng。

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 Cycler 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 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 反应条件说明」。

Stage 1				Stage 2			
Repeat 1 times.				Repeat 40 times.			
2-Temperature Cycle				2-Temperature Cycle			
Deg/Sec	Temp	Secs	Optics	Deg/Sec	Temp	Secs	Optics
NA	42.0	300	Off	NA	95.0	5	Off
NA	95.0	10	Off	NA	60.0	20	On

标准操作方法

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

◆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，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。

◆应用 Thermal Cycler Dice Real Time System III (// 和 Lite: 终卖) 扩增仪的操作方法

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 RT-PCR Buffer III	12.5 μ l	1X
<i>TaKaRa Ex Taq HS</i> (5 U/ μ l)	0.5 μ l	
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.5 μ l	
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*1
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M*1
Probe	1 μ l*2	
Total RNA	2 μ l*3	
RNase Free dH ₂ O	7.5 μ l	
Total	25 μ l	

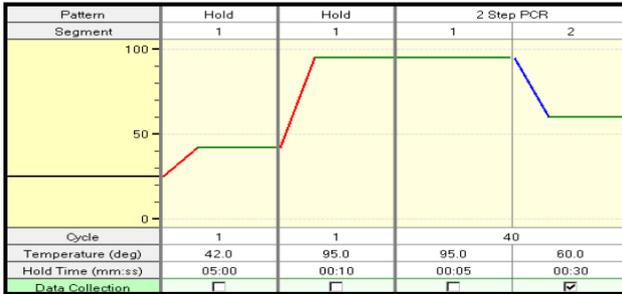
*1 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

*2 使用的探针浓度，与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行。应用 Thermal Cycler Dice Real Time System 时，通常探针终浓度在 0.1~0.5 μ M 范围内进行调整。

*3 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 反应管请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 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。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。有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件说明」。



标准操作方法

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

◆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，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。

◆PCR 反应条件说明

【两步法 PCR】

Step	温度	时间	检测	说明
变性	95°C	3~5 秒	OFF	Real Time PCR 扩增片段通常在 300 bp 以下，只需进行 95°C、3~5 秒的变性设置。
退火/延伸	56°C~64°C	20~30 秒	ON	首先按照各仪器说明书推荐条件进行反应。反应条件可以在 56°C~64°C 范围内进行调整。反应性能较差时，可以适当增加这一步的反应时间。
		(31~34 秒) *		

循环数: 30~45 Cycles

* 使用 Real Time PCR 扩增仪时必须根据仪器型号设定不同时间。

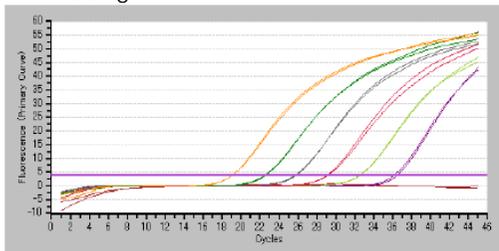
Applied Biosystems 7300 设定为 31 秒或更长; Applied Biosystems 7500 设定为 34 秒或更长。

● 实验例

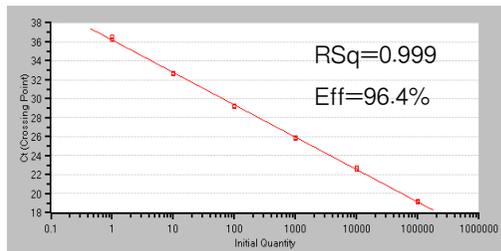
1. 以 Mouse Liver 中提取的 Total RNA 1 pg~100 ng 为模板，灭菌水替代模板作为阴性对照反应，使用 Thermal Cycler Dice Real Time System 进行 Real Time One Step RT-PCR 反应，使用 TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific) 的引物和探针。

2. 结果。

< Crossing Point method >

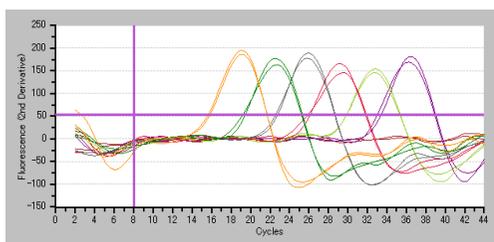


扩增曲线图

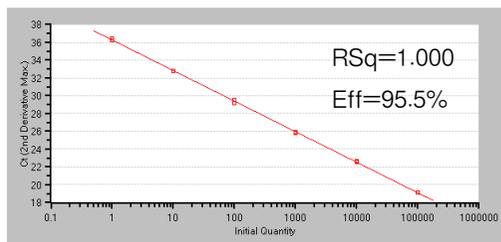


标准曲线图

< 2nd Derivative Maximum method >



2nd derivative 图



标准曲线图

3. 结果分析。

使用 1 pg~100 ng 的 Total RNA 能很好地检出目的基因，制作的标准曲线线性关系良好，可以在实验浓度范围内进行准确定量。

● 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（1）或（2）进行处理。

（1）干热灭菌（180℃，60 min）。

（2）用 0.1% DEPC 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℃，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】

建议使用 GTC 法（异硫氰酸胍法）制备的高纯度 RNA。

● 关联产品

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

Premix Ex Taq[™] (Probe qPCR) (Code No. RR390Q/A/B)

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

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

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

PrimeScript, *Premix Ex Taq*, 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: <http://www.takarabiomed.com.cn>

v202206Da