

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°C，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 SYBR® Green 分析法和 TaqMan® 探针分析法，可以根据实验目的，选择与 SYBR® *Premix Ex Taq II* (Tli RNaseH Plus)、*Premix Ex Taq* (Probe qPCR) 等定量试剂组合使用。

注意：Takara Bio 使用 SYBR® Green I 作为研究试剂已得到 Molecular Probes Inc. 的许可。SYBR® 为 Molecular Probes Inc. 的注册商标。

● 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 DNA 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。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 也可以单独购买 (Code No.9160)。

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，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. 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 反应的最佳试剂。
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 SYBR® Green 分析法和 TaqMan® 探针分析法各自最适反应体系，可以根据分析方法选择体系。

SYBR® Green 分析法和 TaqMan® 探针分析法区别如下：

- 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，结果精度降低。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. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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，SYBR® Green qPCR 法最多可使用 1 μg 的 Total RNA，TaqMan® Probe qPCR 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。

<SYBR® 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

< TaqMan® Probe 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	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°C或更低温度保存。

注意：1) 在反转录反应中，SYBR® Green qPCR法的RT Primer Mix 用量为 1 μl ，TaqMan® Probe qPCR 法的用量为 4 μl 。

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SYBR® *Premix Ex Taq II* (Tli RNaseH Plus) (Code No.RR820A/B)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* (Probe qPCR) (Code No.RR390A/B)。

◆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)。

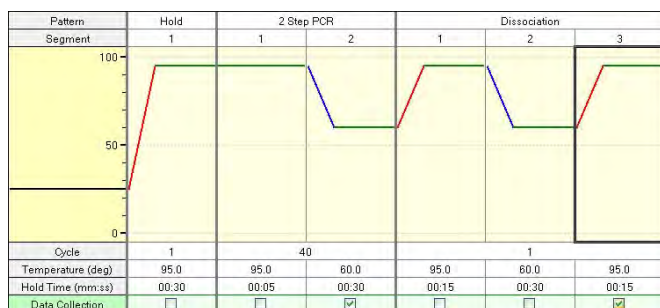
试剂	使用量	终浓度
SYBR® <i>Premix Ex TaqII</i> (Tli RNaseH Plus) (2×)	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	1.0 μl	0.4 μM*1
PCR Reverse Primer (10 μM)	1.0 μl	0.4 μM*1
RT 反应液 (cDNA 溶液)	2 μl*2	
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	8.5 μl	
Total	25 μl	

*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。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 TaqHS* 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，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

按仪器使用说明书要求进行实验操作 (Life Technologies)。

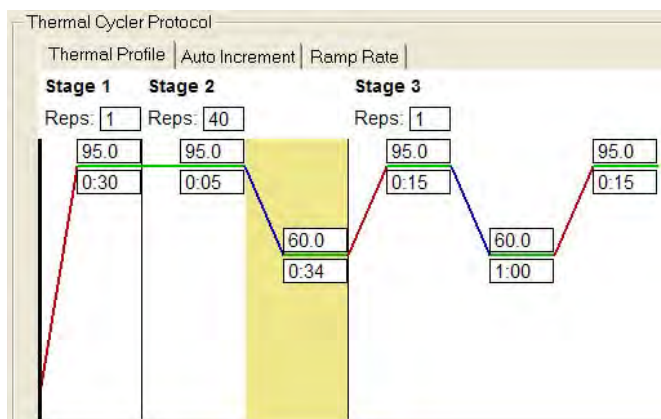
1. 按下列组份配制 PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

试剂	使用量	使用量	终浓度
SYBR® Premix Ex Taq II(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	1×
RT 反应液 (cDNA 溶液)	2 μl	4 μl	*2
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 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,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,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

A. Total RNA 中混有基因组 DNA 的去除效果验证

[方法]

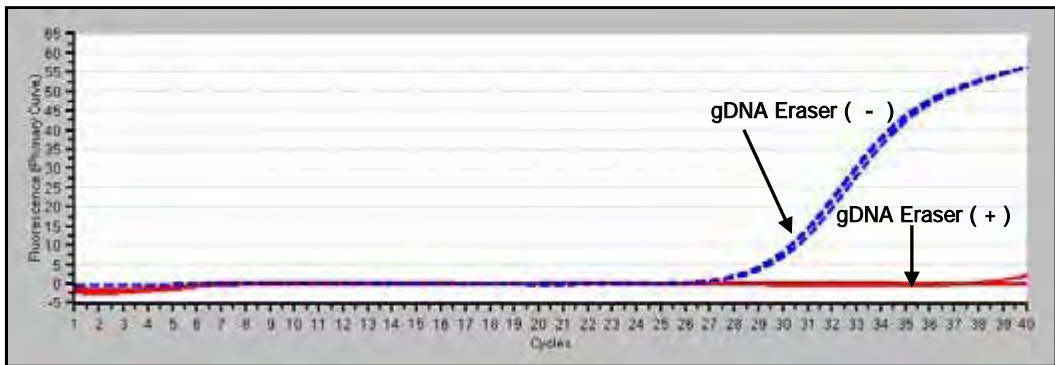
使用提取的 Mouse Liver RNA 2 μg 进行 gDNA Eraser 添加 (+) / 不添加 (-) 实验后, 再进行 RTase 不添加的反转录反应, 以确认 Total RNA 中基因组 DNA 的残存量。每个反应做 3 个复孔。

Real Time PCR反应

试剂: SYBR® *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time)(Code No. RR041)
模板: 上述反转录反应液 2 μl
反应体积: 25 μl
Target Gene: Mouse *Rsp18*
反应条件: Thermal Cycler Dice Real Time System 标准反应条件

[结果]

Real Time PCR 扩增曲线图如下:



从以上扩增曲线结果可以看出, Total RNA 经过 gDNA Eraser 处理后, 没有检测到基因组 DNA 的残留。

B. 两种 PrimeScript 试剂盒 cDNA 合成量比较

[方法]

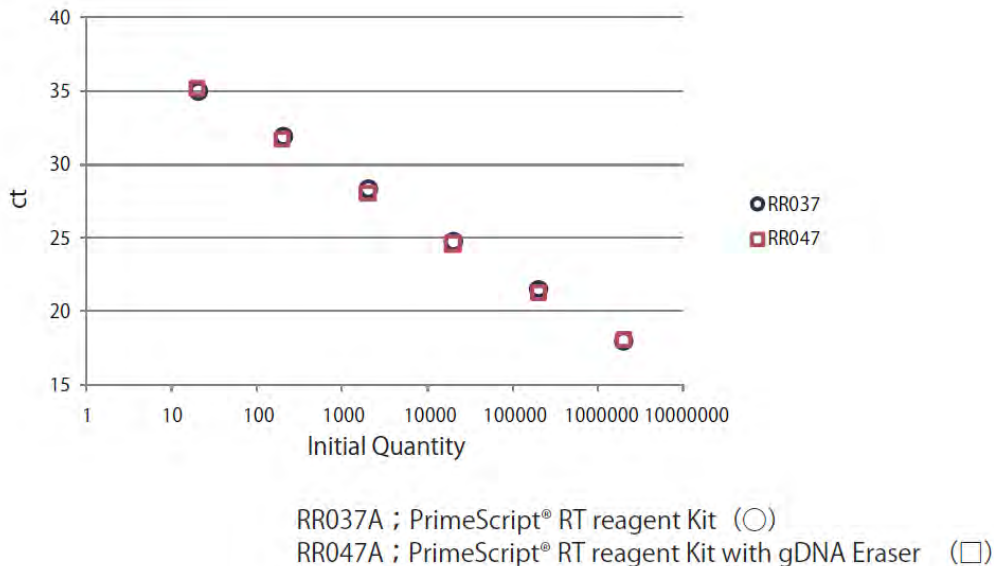
反转录反应

试剂: RR047A ; PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)
RR037A ; PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)
模板: Mouse Liver 来源 Total RNA (2 pg-2 μg) 或灭菌水
反应体积: 20 μl
RT Primer : RT Primer Mix
反应条件: 各 Kit 推荐的反应条件

Real Time PCR反应

试剂: SYBR® *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time)(Code No. RR041A)
模板: 上述反转录反应液 2 μl
反应体积: 25 μl
Target Gene: Mouse *Rsp18*
反应条件: Thermal Cycler Dice Real Time System 标准反应条件

[结果]



Reagent	R ²	扩增效率 (%)	Standard Curve
RR037A	1.000	95.9	Y= - 3.425×LOG (X) + 43.05
RR047A	0.999	95.7	Y= - 3.429×LOG (X) + 42.94

从以上实验结果可以看出，使用PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 进行反转录反应，与Takara深受好评的RR037同样，可获得高质量的Real Time PCR用cDNA。

● 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°C , 60 min)

(2) 用 0.1% DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液在 37°C 下处理 12 小时。然后在 120°C 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°C , 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 用灭菌蒸馏水或灭菌的 TE 缓冲液溶解。

● **关联产品**

SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A)

SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A)

Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) (Code No. RR390A)

EASY Dilution (for Real Time PCR) (Code No. 9160)

Thermal Cycler Dice Real Time System II (Code No. TP900/TP960)

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A/B)

PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036A)

RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[M78] gDNA Eraser

This product is the subject of the pending JP patent application.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from TAKARA BIO INC.

If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 543 7247 or from our website at www.takara-bio.com.

Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements.

All marks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

技术咨询热线：

0411-87641685，87641686

4006518761，4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>

v201211Da