

Code No. RR600A

研究用

---

**TAKARA**

One Step PrimeScript™ III

RT-qPCR Mix

---

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
● 操作注意	3
● 使用注意	3
● 操作方法	3
● 实验例	7
● 附 录	8
● 关联产品	8

## ● 制品说明

One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix 是采用探针法 (5' nuclease 法) 进行 1 step Real Time RT-qPCR 的专用试剂盒。本制品是 2X premix 型, -20°C 保存时不会冻结, 使用时只需要加入检测目的基因所需的引物、探针及模板样品, 即可快速开始反应。反转录反应和 qPCR 反应在单个反应管中连续进行, 操作简单。反转录反应使用新型的 PrimeScript III RTase, 该酶在维持 PrimeScript RTase 的特异性和延伸性的同时, 进一步提高了耐热性能 (高达 55°C), 对于以具有复杂二级结构 RNA 起始合成 cDNA 的反应能够发挥更佳作用。cDNA 合成后, 使用 *TaKaRa Taq*<sup>TM</sup> HS 进行高特异性及高扩增效率的 PCR, 通过荧光标记的探针进行 Real Time 检出。此外, 由于该制品经优化后对于肝素 (血液) 或腐殖酸 (土壤) 等阻害物具有很高的耐受性, 因此可以用于多种样品的 1 step Real Time RT-qPCR 检测。本制品可以用于从基因的表达分析至 RNA 病毒检出等多种用途。

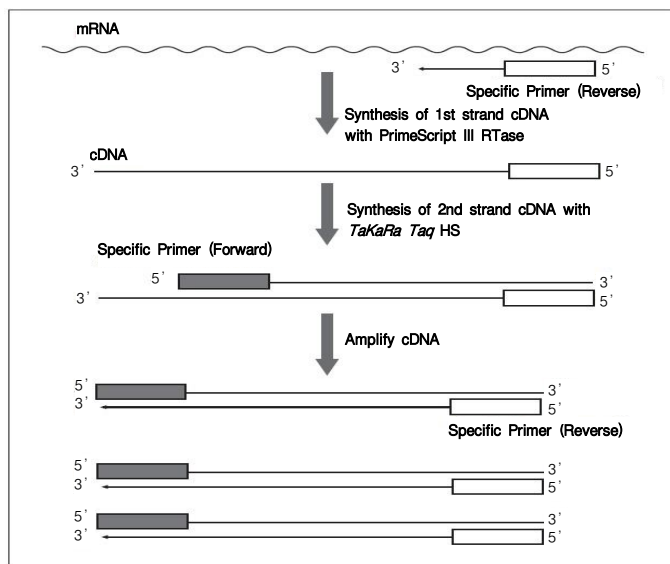
## ● 试剂盒原理

本制品首先使用反转录酶 PrimeScript III RTase 将 RNA 反转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板使用 *TaKaRa Taq* HS 在同一反应管内连续进行 Real Time PCR 扩增反应, 通过探针的荧光信号进行实时监测。

### 1. RT-PCR

RNA 虽不能直接作为 PCR 的模板, 但是通过使用反转录酶将 RNA 合成 cDNA, 就可以利用 PCR 对 RNA 进行分析, 这就是 RT-PCR, 是高灵敏度的 RNA 检测方法。本制品使用 One Step RT-PCR 法, 其原理如下图所示。

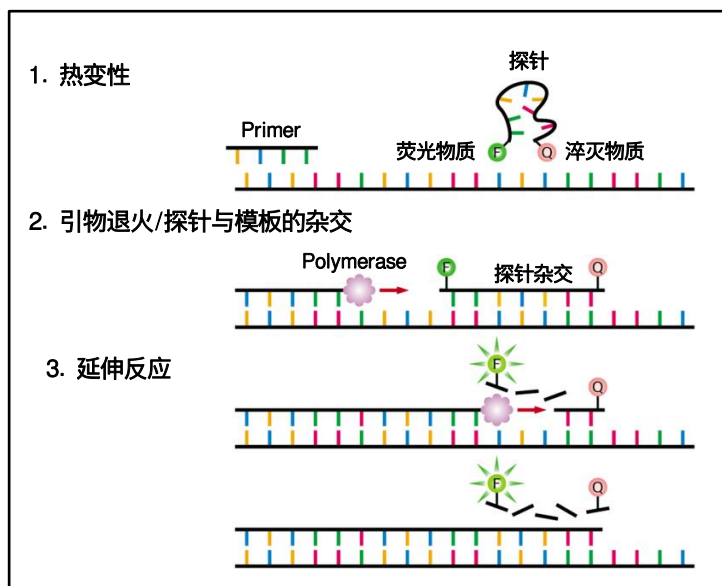
One Step RT-PCR 先使用 PCR 用特异性引物 (Reverse) 进行反转录反应, 然后以合成的 cDNA 为模板, 经特异性引物 (Forward, Reverse) 进行 PCR 扩增, 整个反应在同一个反应管中连续进行。



One Step RT-PCR 原理

### 2. 荧光检出

本制品使用了在寡核苷酸 5' 端带有荧光物质 (如: FAM 等), 同时 3' 端带有淬灭物质 (如: TAMRA, BHQ1 等) 修饰的检出探针。退火条件下, 探针与模板 DNA 特异性杂交, 但是 5' 端的荧光物质受到 3' 端淬灭物质的制约, 不能发出荧光。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, 从而解除淬灭物质的制约, 游离的荧光物质发出荧光。该过程中产生的荧光可以通过 Real Time PCR 装置检出。这些原理组合形成的方法, 可以对样品进行实时定量, 被称为 One Step RT-q (quantitative) PCR。



## ● 制品内容 (25 μl 反应 × 200 次)

1. One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix(2X)	625 μl × 4
2. RNase Free H <sub>2</sub> O	1.25 ml × 2
3. ROX Reference Dye (50X) *	100 μl
4. ROX Reference Dye II (50X) *	100 μl

\* : 用以校正 Applied Biosystems 等 Real Time PCR 仪的孔与孔之间产生的荧光信号差。

### ◆ 添加 ROX Reference Dye 的机型

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

### ◆ 添加 ROX Reference Dye II 的机型

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

### ◆ 不需要添加的机型

Thermal Cycler Dice™ Real Time System 系列 (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990, etc.)

Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760: 终卖)

LightCycler 系列 (Roche Diagnostics)

CFX 系列 (Bio-Rad)

## 试剂盒外必备材料

### 1. Real Time PCR 扩增仪

#### 【本产品适用的机型】

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

Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760: 终卖)

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

LightCycler 96 System (Roche Diagnostics)

CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

### 2. 专用的离心管或反应板

### 3. PCR 引物

### 4. 检测用探针

## 5. 微量移液器和枪头

● **保存:** -20℃。

### ● **特 长**

1. Probe 检出用 One Step RT-qPCR 试剂
2. -20℃保存也不会冻结的 2X Premix 试剂, 操作简便
3. 采用新型耐热性反转录酶 PrimeScript III RTase, 可在高温下 (~55℃) 进行反转录反应
4. 阻碍物质耐受性高
5. 再现性高

### ● **操作注意**

以下为使用本试剂盒时的注意事项, 使用前请认真阅读。

- 1) One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (2X) 在使用前通过轻轻颠倒混匀, 并瞬时离心将管盖上附着的液体收集于管底。使用后, 立即于-20℃保存。另外, 制品取出时有可能会冻结, 请融化后正常使用, 不影响制品品质。当保存过程中出现白色浑浊现象时, 可将本组分轻轻颠倒混匀后, 瞬时离心使管盖上附着的液体收集于管底, 再使用。
- 2) 分取试剂时请务必使用新的一次性枪头, 以避免样品间的污染。
- 3) 当同时需要进行多个 Real Time One Step RT-PCR 反应时, 将反应液配成必要量+ $\alpha$ 的混合液 (One Step PrimeScript RT-qPCR Mix (2X), RNase Free H<sub>2</sub>O, Primer · Probe 及 RNA 样品)。这样分取的试剂体积更准确, 可以减少试剂损失, 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。
- 4) 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 进行反转录反应。

### ● **使用注意**

本制品中使用的 *TaKaRa 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 95℃、5~15 分钟的酶活性化反应。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℃、10 sec。

### ● **操作方法**

请按照各机型的说明书进行操作。RNA 制备方法请参考<附录: RNA 样品的制备>

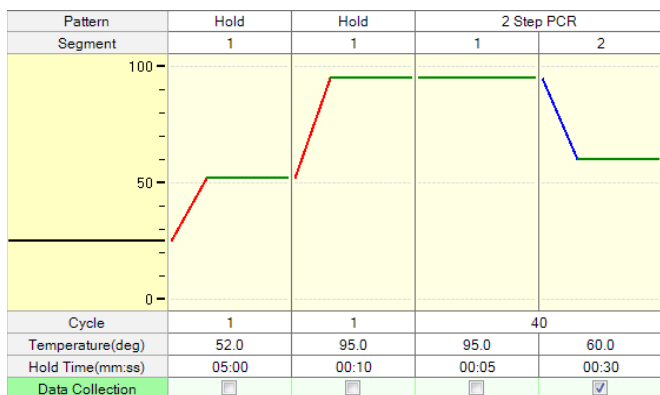
#### ◆ **应用 Thermal Cycler Dice Real Time System III 时的操作方法**

- 1) 按下表配制 RT-PCR 反应液 (请在冰上进行), 在每个离心管或反应板的每孔中添加 25  $\mu$ l 反应液。

试剂	使用量	终浓度
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix(2X)	12.5 $\mu$ l	1X
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M <sup>*1</sup>
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M <sup>*1</sup>
Probe (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M <sup>*2</sup>
RNA 样品 <sup>*3</sup>	≤2.5 $\mu$ l	
RNase Free H <sub>2</sub> O	X $\mu$ l <sup>*4</sup>	
Total	25 $\mu$ l	

## 2) RT-qPCR 反应

PCR 反应管或反应板轻微离心后，放入 Thermal Cycler Dice Real Time System，按照下述条件开始反应。反应推荐按照下述的标准操作流程进行。首先，尝试该操作流程，然后根据需要优化 PCR 反应条件（参照「RT-qPCR 反应条件说明」）。



Pattern 1: 反转录反应

52°C 5 min  
95°C 10 sec

Pattern 2: PCR 反应

Cycle: 40  
95°C 5 sec  
60°C 30 sec

3) 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。

\* 1~4: 请参考「RT-qPCR 反应条件说明」。

## ◆ 应用 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System 的操作方法

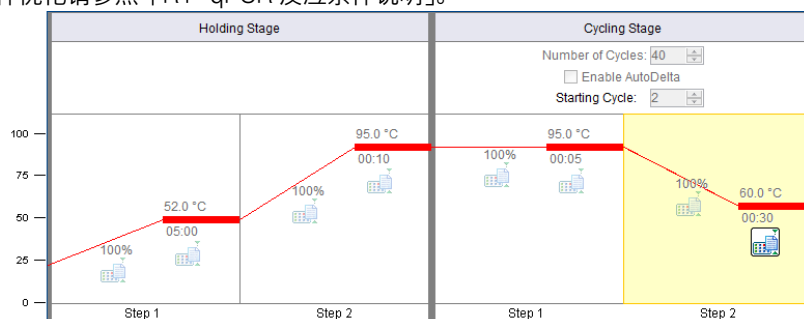
1) 按下表配制 RT-PCR 反应液（请在冰上进行），在每个离心管或反应板每孔中添加 20  $\mu$ l 或 50  $\mu$ l 反应液。

试剂	使用量	使用量	终浓度
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (2X)	10 $\mu$ l	25 $\mu$ l	1X
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M <sup>*1</sup>
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M <sup>*1</sup>
Probe (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M <sup>*2</sup>
ROX Reference Dye II (50X) <sup>*6</sup>	0.4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	
RNA 样品 <sup>*3</sup>	$\leq 2$ $\mu$ l	$\leq 5$ $\mu$ l	
RNase Free H <sub>2</sub> O	X $\mu$ l <sup>*4</sup>	X $\mu$ l <sup>*4</sup>	
Total	20 $\mu$ l	50 $\mu$ l	

## 2) 进行 RT-qPCR 反应

反应管及反应板轻微离心后，放入 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System，按照以下条件开始反应。

建议按照下述标准 protocol 进行反应。首先尝试该 protocol，然后再根据需要优化 PCR 条件。关于 PCR 条件优化请参照「RT-qPCR 反应条件说明」。



Holding Stage : 反转录反应

52°C 5 min

95°C 10 sec

Cycling Stage: PCR 反应

Cycles: 40

95°C 5 sec

60°C 30 sec \*5

### 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。

\* 1~6: 请参考「RT-qPCR 反应条件说明」。

### ◆应用 LightCycler 96 System 的操作方法

1) 按下表配制 RT-PCR 反应液 (请在冰上进行), 在每个离心管或反应板每孔中添加 20  $\mu$ l 反应液。

试剂		使用量	终浓度
One Step PrimeScript III RT-qPCR (2X)		10 $\mu$ l	1X
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)		0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M*1
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)		0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M*1
Probe (10 $\mu$ M)		0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M*2
RNA 样品*3		$\leq$ 2 $\mu$ l	
RNase Free H2O		X $\mu$ l*4	
Total		20 $\mu$ l	

### 2) RT-qPCR 反应

反应管或反应板轻微离心后放入 LightCycler 中按下述条件开始反应。

建议按照下述标准 Protocol 操作。首先尝试使用该 Protocol, 然后根据需要优化 PCR 反应条件, 请参考「RT-qPCR 反应条件说明」。

标准操作方法

Preincubation:

Cycle: 1

52°C 5 min

95°C 10 sec

2 - Step Amplification

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 30 sec\*5

3) 反应结束后确认扩增曲线, 如果要进行定量需制作标准曲线等。

分析方法请参考仪器的操作手册。

\* 1~5 : 请参考「RT-qPCR 反应条件说明」。

◆ 应用 CFX96 real-time PCR detection system 时的操作方法

1) 反应液的配制

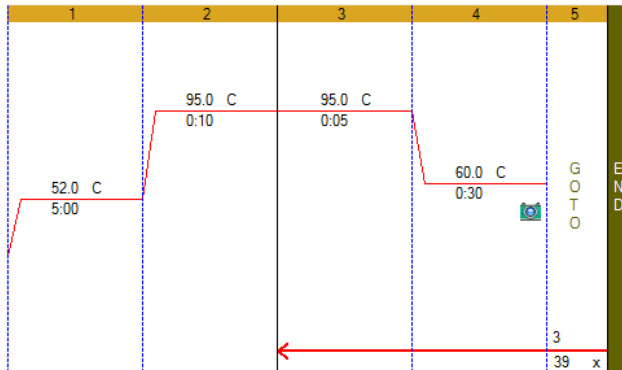
按照下表配制反应液（请在冰上进行），在每个离心管或反应板每孔中添加 20 μl 反应液。

试剂	使用量	终浓度
One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (2X)	10 μl	1X
PCR Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM <sup>*1</sup>
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM <sup>*1</sup>
Probe (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM <sup>*2</sup>
RNA 样品 <sup>*3</sup>	≤2 μl	
RNase Free H <sub>2</sub> O	X μl <sup>*4</sup>	
Total	20 μl	

2) Real Time RT-qPCR 反应

PCR 反应管及反应板轻微离心后，放入 CFX96，开始反应。

反应建议按照下述标准 Protocol 进行。首先尝试使用该 Protocol，然后根据需要优化 PCR 反应条件，请参考「RT-qPCR 反应条件说明」。



1,2: 反转录反应  
52°C 5 min  
95°C 10 sec

3,4,5: PCR 反应(40 cycles)  
95°C 5 sec  
60°C 30 sec<sup>\*5</sup>  
GO TO 3, 39 cycles

3) 反应结束后确认扩增曲线，进行定量时需制作标准曲线。分析方法参见仪器的操作手册。

\* 1~5: 请参考「RT-qPCR 反应条件说明」。

◆ RT-qPCR 反应条件说明

反转录反应

Step	温度	时间	检测	说明
反转录	42-55°C	5 分钟	OFF	根据 target 调整温度时效果会改善。
变性	95°C	10 秒	OFF	反转录酶的热失活通常设置为 95°C 10 秒钟足够。

PCR 反应 30-45 Cycles

Step	温度	时间	检测	说明
变性	95°C	3-5 秒	OFF	Real Time PCR 的扩增大小一般在 300 bp 以下，95°C 反应 3-5 秒即可。
退火/延伸	56-64°C	20-30 秒 <sup>*5</sup>	ON	首先按照各仪器说明书推荐的条件进行反应。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，增加这一步的反应时间可能会改善。



- \* 1: 通常引物终浓度为 0.2  $\mu\text{M}$  可以得到较好结果, 反应性能较差时, 可以在 0.1~1.0  $\mu\text{M}$  的范围内调整引物浓度。
- \* 2: 使用的探针浓度, 与使用的 Real Time PCR 仪器的型号和探针的荧光标记物质不同而不同。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 Thermal Cycler Dice Real Time System 时, 通常终浓度在 0.1~0.5  $\mu\text{M}$  的范围内研讨。
- \* 3: RNA 样品的添加量在反应液总量的 1/10 以下, 理想的添加范围是 10 pg~1  $\mu\text{g}$ 。目的 RNA 浓度低时, 有可能使用量超过反应液总量的 1/10, 此时可能会对 RT-qPCR 反应有阻害作用。
- \* 4: 按照各 Real Time PCR 仪器的推荐量调整。
- \* 5: 仪器不同, 检出步骤会有不能设置在 30 秒以内的情况。此时, 按照该仪器能设定的秒数设置 (31 秒, 34 秒等)。
- \* 6: 使用 ROX Reference Dye, 请参考下表:

ROX Reference Dye (50X)	ROX Reference Dye II (50X)
StepOne、StepOnePlus、ABI7300/7700/7900HT	ABI 7500、ABI 7500 Fast
不必使用 ROX Reference Dye 的仪器	
Thermal Cycler Dice Real Time System 系列、CFX96、CFX384、Lightcycler	

## ● 实验例

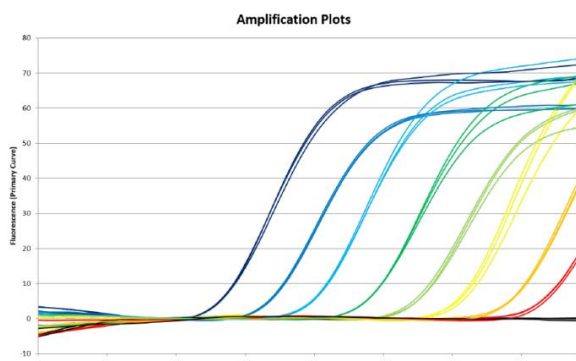
Human ACTB 基因的日差重复性表达分析 (使用 Thermal Cycler Dice Real Time System III)

### 1. 方法

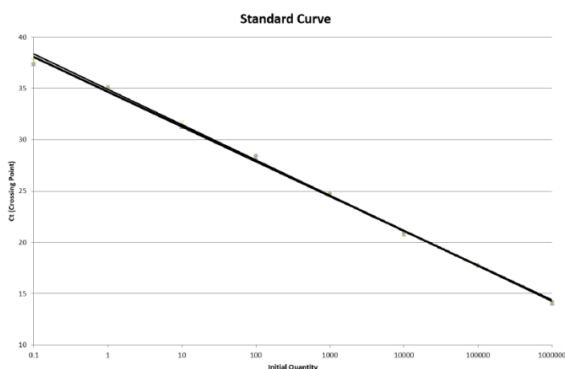
Human HeLa Cell Total RNA (Code No. 636543) 0.1 pg~1  $\mu\text{g}$  为模板, 经 One Step Real Time RT-qPCR 反应, 分 3 日进行 ACTB 基因的表达分析, 制作标准曲线。

### 2. 结果

扩增曲线



各标准曲线如下图, 显示有很高的线性关系 ( $R_{sq}:1$ ) 和稳定的扩增效率 ( $Eff. \geq 95.1\%$ )。



	第 1 日标准曲线	第 2 日标准曲线	第 3 日标准曲线
Rsq	1	1	1
Eff.	96.7%	96.8%	95.1%

另外，各 RNA 起始量不同标准曲线的 Ct 值的最大差值如下表，10 pg 起始时最大，差值为 0.38。

RNA 样品量 (pg)	Log	第 1 日标准曲线	第 2 日标准曲线	第 3 日标准曲线	最大差值
1,000,000	6	14.80	14.69	14.71	0.11
100,000	5	18.33	18.41	18.18	0.23
10,000	4	21.53	21.40	21.34	0.19
1,000	3	25.42	25.36	25.33	0.09
100	2	29.09	28.83	29.03	0.26
10	1	32.02	31.85	32.23	0.38
1	0	35.84	35.77	35.77	0.07
0.1	-1	38.12	38.15	38.29	0.17
0	-	ND	ND	ND	-

\* ND=Not Detected

### 3. 结论

从结果可知，使用 One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (2X)，在  $10^7$  数量级 (0.1 pg 至 1 μg 总 RNA) 的宽范围 RNA 稀释样品中具有很高的日差重复性。

## ● 附录

### RNA 样品的制备

本试剂盒是由 RNA 起始合成 cDNA，然后进行 PCR 扩增的试剂盒。为成功合成 cDNA，需要抑制样品中含有的 RNase 的作用，同时需要避免由使用的器具及溶液等外部引入的 RNase 污染。制备 RNA 时，为避免实验者的汗液或唾液中含有的 RNase 的混入，操作中应注意尽量不讲话，同时戴好一次性手套，且使用 RNA 操作专用实验台等。

#### 【实验器具】

尽量使用一次性塑料器皿。

#### 【溶液】

使用的试剂、灭菌水等全部作为 RNA 实验专用使用。

#### 【RNA 制备方法】

由于本产品对于各反应阻害物有很高的耐受性，多数情况下，简易提取试剂粗提的 RNA 样品起始的反应也能正常进行。但是，如果出现不能正常检出，或者需要准确度更高、稳定性更好的结果时，推荐使用纯度更高的 RNA 样品。从培养细胞及组织样品中提取高纯度 total RNA 时，可使用 spin column 型的 NucleoSpin RNA(Code No. 740955.10/.50/.250)或 AGPC 等的简便试剂 RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)。

## ● 关联产品

RNase-free Water (Code No. 9012)

NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250)

NucleoSpin RNA Plus (Code No. 740984.10/.50/.250)

NucleoSpin RNA Virus (Code No. 740956.10/.50/.250)

RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

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

PrimeScript, *TaKaRa 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](http://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>

v202203Da