

Code No. CN830S
CN830A

研究用

TAKARA

TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] II
FAST qPCR

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
● 试剂盒外必备主要试剂和仪器	2
● 保 存	2
● 特 长	2
● 使用注意	2
● 操作方法	3
● 实验条件的选择方法	4
● 附 录	5
● 关联产品	6

● 制品说明

本制品是采用 TB Green 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。本制品将适用于快速 PCR 反应的突变型 *Taq* DNA 聚合酶和抑制引物二聚体的因子组合，优化了反应液组成，在保证特异性的同时，实现快速 PCR 反应和在宽广的动态定量区域内对靶基因进行准确定量、检测，重复性好。此外，2X Premix 试剂中，已预先添加了 Tli RNaseH(耐热性 RNaseH)和 UNG，以 cDNA 作为模板进行 PCR 反应时，Tli RNaseH 可以很好地抑制由于 cDNA 中残存 mRNA 对 PCR 反应造成的阻害作用，UNG 可避免扩增过程中的交叉污染。

本制品是 2X 浓度的 Premix 型试剂，预先混有通用参比染料和可视化色素，无需额外在仪器中添加参比试剂以校正孔间荧光信号，可视化色素可以最大限度地减少操作错误。

本制品适用的 PCR 仪

- Thermal Cycler Dice™ Real Time System IV (Code No. TP1000)
- Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
- Thermal Cycler Dice Real Time System // (Code No. TP900/TP960: 终卖)
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760: 终卖)
- CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (Code No. 640231/640232)
- Applied Biosystems™ QuantStudio™ 3 / 5 Real-Time PCR System、7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- LightCycler 96/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics)
- CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

● 试剂盒原理

本制品使用突变型 *Taq* HS 进行 PCR 扩增，通过检测反应液中 TB Green 的荧光强度，达到监控 PCR 产物扩增量的目的。

1. PCR

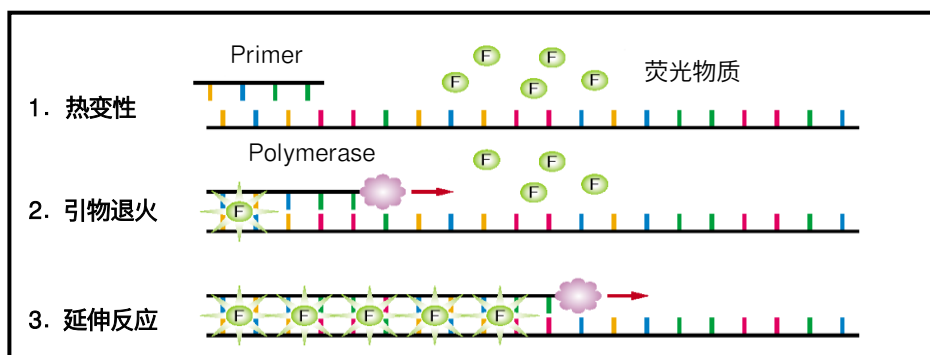
PCR 法是以微量 DNA 进行目的片段扩增的方法。通过 DNA 链的热变性、引物退火、DNA 聚合酶作用下引物的延伸三个步骤循环往复，可在短时间内扩增 DNA 达 100 万倍以上。

本制品在 PCR 扩增中，由于使用了 Hot Start PCR 用突变型 *Taq* DNA 聚合酶，能够抑制在调制反应液等低温条件下由引物错配或引物二聚体产生的非特异性扩增，可以进行高灵敏度的检出。

2. 荧光检出（嵌合荧光检测法）

TB Green 与双链 DNA 结合后发出荧光，所以可以通过检测反应体系中的 TB Green 荧光强度，达到检测 PCR 产物扩增量的目的。

具体原理见下图。通过 PCR 反应生成双链 DNA，TB Green 与双链 DNA 结合发出荧光，通过检测 PCR 反应液中的荧光信号强度，不仅可以对目的基因进行定量，同时还可以测定扩增的目的 DNA 片段的融解温度。



● 制品内容 (CN830S: 25 μl 反应×80 次、CN830A: 25 μl 反应×400 次)

	Code No. CN830S	CN830A
TB Green Premix Ex Taq II FAST qPCR (2X) *1	1 ml×1	1 ml×5
EASY Dilution II (for Real Time PCR) *2	1 ml×1	1 ml×3

*1: 内含突变型 *Taq* HS, dNTP Mixture, Mg²⁺, Tli RnaseH、Uracil DNA Glycosylase (UNG)、heat-labile、通用参比染料、可视化色素和 TB Green。

*2: 在逐步稀释 total RNA 和 cDNA 时, 将其用作稀释溶液。如果用水或 TE 稀释, 可能无法进行准确稀释, 但使用 EASY Dilution II (for Real Time PCR) 可以准确稀释至低浓度, 并在宽广的范围内获得准确定量的标准曲线。请注意, 此缓冲系统不会影响反转录或 PCR 的反应性。稀释的模板溶液可以直接用作反转录反应或 PCR 反应的模板。

注: 请勿使用 EASY Dilution (for Real Time PCR) (Code No. 9160) 稀释本制品。

● 试剂盒外必备主要试剂和仪器

1. Real Time PCR 扩增仪
2. 实验专用反应管或反应板
3. PCR 引物*3
4. 灭菌水
5. 微量移液器和枪头

*3: 引物设计请参考“附录”。

● 保存:

4°C保存: 3个月性能稳定。

避光保存, 避免污染。

长期保存请于-20°C保存。一旦开始使用, 请于4°C保存并在3个月之内使用完。

● 特长:

1. 通过 Real Time PCR 反应, 可以快速、准确地对目的基因进行检测、定量。
2. 本制品是预先混有 TB Green 的 2X 浓度的 Premix 试剂, 只需加入引物、模板、灭菌水便可通过嵌合荧光检测法进行 Real Time PCR 反应。
3. PCR 反应使用的是可进行快速 PCR 反应的突变型 *Taq* HS。缓冲 buffer 结合了引物二聚体抑制因子, 适用于实时 PCR。最大限度的抑制了引物二聚体的形成, 可以在较短的延伸时间内, 以高灵敏度的 S/N 比进行检测。
4. 在 2X Premix 试剂中, 预先添加了耐热性 RNaseH (Tli RNaseH) 和 UNG, Tli RNaseH 可以很好地抑制以 cDNA 作为模板进行 PCR 反应时, 由于 cDNA 中残存 mRNA 对 PCR 反应造成的阻害作用, UNG 可避免扩增过程中的交叉污染。
5. 预先在 2X 预混试剂中添加了通用参比染料和可视化色素, 无需在仪器中额外添加参比试剂以校正孔间荧光信号。

● 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. 进行 Real Time RT-PCR 反应时, 反转录反应推荐如下试剂。与本制品组合使用, 可以得到可信用度高的结果。

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

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

PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code No. RR047A/B)

2. 使用前, 请上下轻轻颠倒混匀, 避免产生气泡, 试剂混匀后再使用。试剂混合不均匀会造成反应效果不佳。

(1) 请勿涡旋振荡混匀。

(2) TB Green *Premix Ex Taq* II FAST qPCR (2X)在-20℃保存时，可能会产生白色或淡黄色的沉淀。
可用手握缓慢溶解，或于室温短时间避光放置后，上下颠倒混匀直至沉淀全部消失。

(3) 沉淀会导致试剂组份不均匀，必须混匀后再使用。

3. 配制反应液时，试剂请于冰上放置。

4. 本制品中含有荧光染料 TB Green，配制 PCR 反应液时应避免强光照射。使用后的 TB Green *Premix Ex Taq* II FAST qPCR (2X) 应立即避光存储。

5. 反应液的配制、分装请一定使用新的一次性枪头、尽量避免样品间的污染。

● 操作方法

※ 请按照各装置的使用说明书进行操作。

1. 按下列组份配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

<1 反应体系>

试剂	使用量	终浓度
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II Fast qPCR (2X)	12.5 μl	1X
PCR Forward Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM ^{*1}
DNA 模板 (<100 ng) ^{*2}	≤2.5 μl	
灭菌水	x 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: 模板 DNA 添加量最好在 100 ng 以下。以 RT-PCR 反应的 cDNA (RT 反应液) 为模板时，添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2. 开始 Real Time PCR 反应。

建议采用下面的 Shuttle PCR 标准操作流程进行 PCR 反应。

首先尝试使用下面的操作流程，必要时进行 PCR 反应条件的优化。使用 Tm 值较低的引物等进行 Shuttle PCR 难以扩增时，进行三步法 PCR 扩增反应。

Shuttle PCR 扩增标准操作流程：



Hold (UNG)
Cycle: 1
25°C 10 分] *5

Hold (预变性)
Cycle: 1
95°C 30 秒

2 step PCR^{*4}
Cycles: 40
95°C 5 秒
60°C 10 秒

Dissociation

* 4: 优化 PCR 反应条件请参照「实验条件的选择方法」。

* 5: 如果怀疑有 PCR 产物 (包含 dUTP) 污染，请进行 25°C 10 分钟的步骤。在 UNG 的作用下，可降解上次 PCR 反应扩增获得的产物。

※使用注意:

本制品中使用的突变型 *Taq* HS 是利用抗 *Taq* 抗体抑制 DNA 聚合酶活性的 Hot Start PCR 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 分钟的酶活性活化反应。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。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. 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。

● 实验条件的选择方法

如果按照推荐条件 (Shuttle PCR 标准操作流程) 进行反应, 反应性能不好时, 请按照下面的方法进行引物浓度和 PCR 反应条件的研讨。

选择实验条件时, 从反应特异性与扩增效率两方面进行综合考虑。要求能同时满足这两个条件的反应体系, 才可以在较大浓度范围内进行准确定量。

○ 反应特异性高的实验体系应具备以下条件:

- No Template Control 时不产生引物二聚体等非特异性扩增。
- 不产生目的扩增产物以外的非特异性扩增。

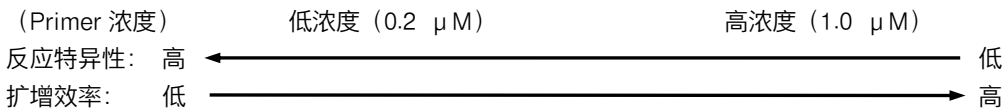
○ 扩增效率高的实验体系应具备以下条件:

- 扩增产物起峰更早 (Ct 值小)。
- PCR 扩增效率高 (接近理论值 100%)。

【引物浓度的研讨】

引物浓度与反应特异性及扩增效率间的关系如下:

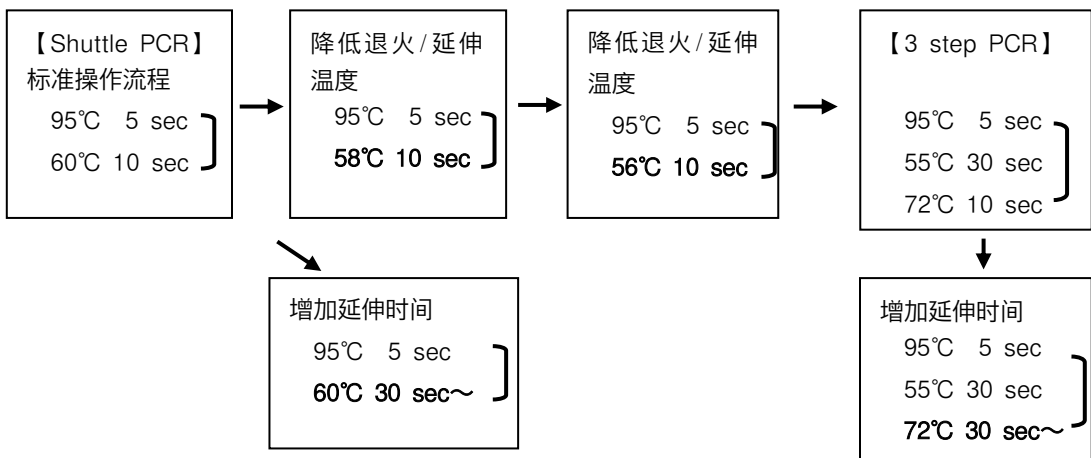
要提高反应特异性时降低引物浓度; 要提高扩增效率时提高引物浓度。图示如下:



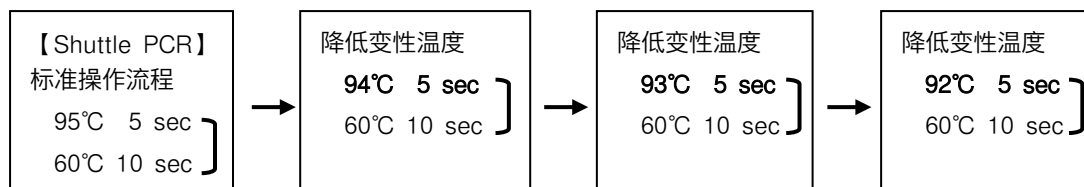
【PCR 反应条件的研讨】

○ 要提高扩增效率时

(1) 通过降低退火/延伸温度或变更为 3 Step PCR、或通过增加延伸时间可改善扩增效率。请按照以下顺序进行研讨。

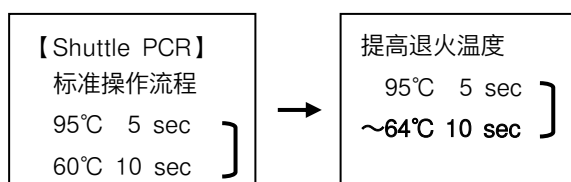


(2) 通过从 95°C 至 92°C 每间隔 1°C 降低变性温度可改善扩增效率。



○ 要提高反应特异性时

提高退火温度可改善反应特异性。同时确认扩增效率，在满足这两个条件下进行研讨。



○ 预变性。

预变性条件通常设定为 95°C、30 sec，使用此条件对于难变性的环状质粒 DNA 和基因组 DNA 模板基本上都能够很好的变性。根据模板状态，可以延长至 95°C、1~2 分钟，但是时间过长酶容易失活，不推荐使用 2 分钟以上的变性条件。

● 附录

1. 引物设计

为了有效进行 Real Time PCR 反应，设计反应性能良好的 PCR 引物非常重要。请根据以下原则，设计 PCR 扩增效率高、无非特异性扩增反应的引物。

■ 扩增产物

扩增产物长度	80~150 bp 较为合适（可以扩增至 300 bp）
--------	------------------------------

■ 引物

引物长度	17~25 mer
GC 含量	40~60% (45~55%理想)
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°C Primer3: 60~65°C
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	3' 端避免 GC rich 或 AT rich。 3' 端碱基最好为 G 或 C。 3' 端尽量避免碱基为 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。 两条引物间的 3' 末端避开有 2 个碱基以上的互补序列。
特异性	使用 BLAST*2 检索确认引物的特异性。

*1 OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights)

*2 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

特别提示：本公司提供用于基因表达定量分析的引物探针设计合成服务

本公司以美国 NCBI Data Base 上登录的 Human、Mouse、Rat、Cow、Dog、Chicken、Arabidopsis、Oryza 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 适于本制品使用，可省略 PCR 反应条件优化实验。

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!

● **关联产品**

TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B/L/W/LR/WR)

TB Green[®] Premix DimerEraser[™] (Perfect Real Time) (Code No. RR091Q/A/B)

TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] GC (Perfect Real Time) (Code No. RR071Q/A/B)

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

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

One Step TB Green[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR066A/B)

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

One Step TB Green[®] PrimeScript[™] PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR096A/B)

Thermal Cycler Dice[™] Real Time System IV (Code No. TP1000)

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

CronoSTAR[™] 96 Real-Time PCR System (Code No. 640231/640232)

CronoSTAR[™] Portable Real-Time PCR System (Code No. 640245/640247/640249)

TB Green is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Premix Ex Taq, DimerEraser, PrimeScript, CronoSTAR, 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>

v202307Da