

Code No. CY501

研究用

Takara

CycleavePCR™ Core Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 试剂盒原理	1
● 制品内容	1
● 保 存	2
● 试剂盒特点	2
● 使用注意	2
● 操作方法	2
● 实验例	3
● 附 录	4
● 参考文献	5
● 关联产品	5

● 制品说明

CyclecleavePCR Core Kit 是采用 Cycling Probe 法进行 Real Time PCR 反应的专用试剂盒。该方法不仅秉承了 Real Time PCR 法的快速性、定量性等特点，而且还具有检出特异性高的优势。使用该方法能够简单、准确地对目的基因进行定性、定量分析及进行 SNP 分型解析等。使用 Smart Cyclers System 或 Smart Cyclers II System (Cepheid) 等仪器进行实验时可使用本产品。

● 试剂盒原理

1. PCR 反应。

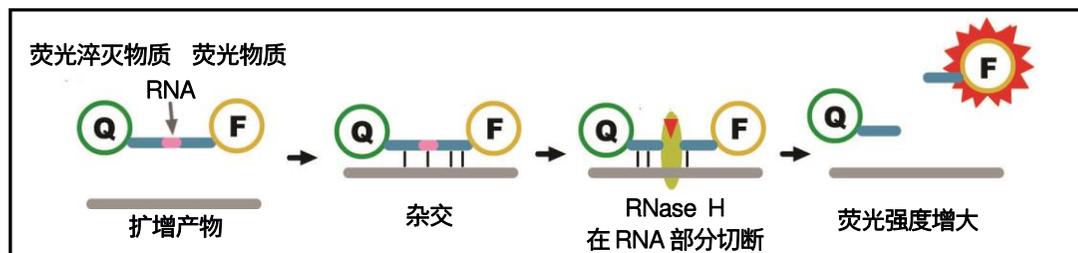
PCR 法是从微量 DNA 起始进行目的片段扩增的技术。将变性、退火、延伸作为一个循环，循环反复，在短时间内能够扩增近 100 万倍的目的基因片段。

本制品使用了 Hot Start PCR 用 DNA 聚合酶 *TaKaRa Ex Taq*[®] HS，能够防止非特异性片段产生及引物二聚体形成，检测灵敏度高。

2. Cycling Probe 法。

Cycling Probe 法是由 RNA 和 DNA 构成的杂合探针与 RNase H 组合使用的高灵敏度检出法，能够高效率地检出扩增过程中及扩增结束时的目的基因片段，具体原理如右图所示：

Cycling Probe 内部含有 RNA 碱基、一端标记荧光物质、另一端标记淬灭物质，当探针处于完整状态时，由于荧光淬灭作用抑制荧光物质发出荧光。当探针与扩增产物中互补序列杂交后，RNase H 在 RNA 碱基处切断探针，淬灭抑制作用解除，荧光物质发出荧光。此时通过测定荧光强度，能够实时监控扩增产物量。如果探针的 RNA 部分与模板不匹配，RNase H 将不能切断探针，所以该检出方法是一种即使有一个碱基不同也能识别的高特异性检出方法，甚至可以识别 SNP。



Cycling Probe 法原理图

● 制品内容 (50 次量)

1. 10× CyclecleavePCR Buffer	125	μl
2. dNTP Mixture (各 2.5 mM)	150	μl
3. Mg Solution (25 mM)	250	μl
4. <i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/μl)	12.5	μl
5. Tli RNaseH II (200 U/μl)	25	μl
6. Positive Control*1 (10 ⁴ copies/μl)	10	μl
7. Positive Control primer Mix (各 10 μM)	10	μl
8. Positive Control probe (FAM 标记)*2 (25×)	10	μl
9. dH ₂ O	700	μl

*1 Positive Control 是质粒，拷贝数由 OD₂₆₀ 简单换算得到，不是实际拷贝数。

*2 Positive Control 用探针，请避光保存。

试剂盒外必备材料

1. Real Time PCR扩增仪
Smart Cycler System (Cepheid)
Smart Cycler II System (Cepheid)

2. Smart Cycler 反应离心管(Cepheid)

3. PCR用引物*3

4. Cycling probe*3

5. 微量移液器和枪头 (使用前高压灭菌)

*3: 请参考“引物设计说明”设计引物, Takara 可以根据客户的要求提供引物或探针的设计以及合成服务, 详情请联系 Takara。

● **保 存:** -20°C。

● 试剂盒特点

1. 由 Real Time PCR 和 Cycling Probe 法相结合, 可以迅速准确地获得检测结果。该检出方法是一种即使有一个碱基不同也能识别的高特异性检出方法。
2. DNA 聚合酶使用了 *TaKaRa Ex Taq* HS, 可以进行 Hot Start 法 PCR 反应, 具有扩增效率高、扩增灵敏度好的特点。

● 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. 当同时需要进行多个 PCR 反应时, 应先配制各种试剂的混合液 (Master Mix; 其中包括 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. 使用 *TaKaRa Ex Taq* HS, Tli RNaseH II 等酶类时, 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。其中含有 50% 的甘油, 操作时需轻轻吹吸混匀。
3. 酶制品应在实验前才从 -20°C 中取出, 使用后也应立即放回 -20°C 中保存。
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. 按下列组分配制 PCR 反应液。配制的反应液体积应大于实际所需的总体积, 然后以 24 μl 的量分装至 Smart Cycler 离心管中。

试剂	使用量	终浓度
10×CycleavePCR Buffer	2.5 μl	1×
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	3 μl	0.3 mM
Mg Solution (25 mM)	5 μl	5 mM
PCR Forward Primer (20 μM)	0.25 μl	5 pmol
PCR Reverse Primer (20 μM)	0.25 μl	5 pmol
Cycling Probe (5 μM) *1	1 μl	
Tli RNaseH II (200 U/μl)	0.5 μl	100 U
<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/μl)	0.25 μl	1.25 U
dH ₂ O	11.25 μl	
Total	24 μl	

*1 通常反应 Cycling Probe 的使用量为 5 pmol，荧光信号强度会随 Cycling Probe 使用量的增减而发生变化。使用 Smart Cycler Real Time System 仪器时，可将荧光信号强度调整至 300~500。

2. 向步骤 1 中制备的混合液中加入 1 μl 的模板，模板的加量也可以大于 1 μl，则 dH₂O 的添加量应根据总体积量作相应的调整。

3. 开始反应

将反应离心管轻微离心后放入 Smart Cycler 扩增仪开始反应，参考下列表格设定反应程序。

Step	温度	时间	检出	说明
预变性	95℃	10~30 秒	OFF	以基因组 DNA 为模板时，可进行 30 秒或延至 1 分钟的热变性（超过 1 分钟有时反应不稳定）。500 bp 以下的模板时，不必设置预变性步骤。
变性	95℃	5 秒	OFF	Real Time PCR 扩增片段通常在 500 bp 以下，只需进行 95℃ 3~10 秒的变性设置。
退火	55℃	10~20 秒	OFF	有非特异性扩增或扩增性能不好时，可以适当对退火温度进行调整。有时适当延长退火时间，也可以改善扩增效率。
延伸	72℃	10~15 秒	ON	扩增片段大小在 100 bp 左右时，延伸时间设定为 10~15 秒。每增加 100 bp 可延长 5 秒。
循环圈数	30~50 Cycles			Smart Cycler 仪器具有在扩增产物被检出时，立即结束反应的功能。这一功能会使分析更加迅速。 ^{*2}

*2 该项功能是 Smart Cycler Software Version 2.0 所拥有的，但是 Smart Cycler Software Version 1.2 可进行 Smart Cycler Software Version 2.0 软件包升级，不需要对仪器本身进行升级。

4. 反应结果分析。

反应结束后，进行扩增曲线分析，判定结果。参考 Smart Cycler System 的操作手册和 Smart Cycler 分析方法的实验例。

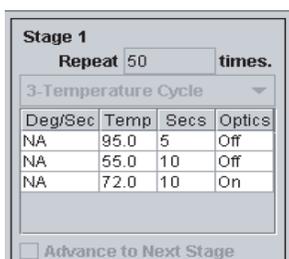
● 实验例

使用 Positive Control 进行 CycleavePCR 反应（使用 Smart Cycler II），所使用的阳性对照是用来验证实验是否遵循要求操作。

1. 按下列组分配制 PCR 反应液。其中包含阳性对照引物和阳性对照探针各 1 μl，按“操作方法”进行操作。

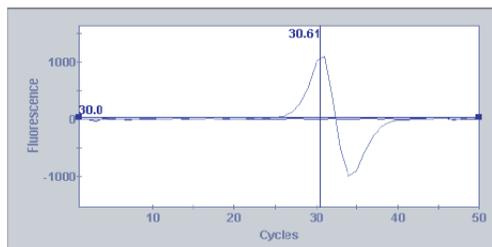
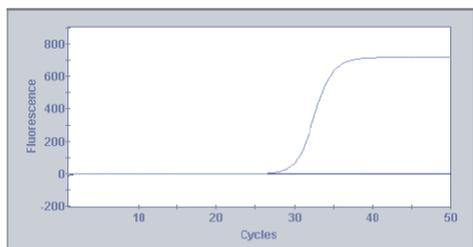
10× CycleavePCR Buffer	2.5 μl
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	3 μl
Mg Solution (25 mM)	5 μl
Positive Control Primer Mix	1 μl
Positive Control Probe	1 μl
Tli RNaseH II (200 U/μl)	0.5 μl
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μl)	0.25 μl
Positive Control	1 μl
dH ₂ O	10.75 μl
Total	25 μl

2. 反应条件设定。



3. 反应结果。

反应结果与预期的含有阳性对照的反应相符。



● 附录

引物设计说明

进行 Real Time PCR 反应时，设计反应性能良好的 PCR 引物非常重要。根据以下原则，可以设计 PCR 扩增效率高，反应特异性强的良好引物。

◆ 扩增产物

PCR 扩增产物长度	100~150 bp 较为合适	可以延长至 300 bp
Tm 值	<90°C	较高的温度可能导致反应效率降低

◆ 设计引物:

引物长度	17-25 mer	
GC 含量	40-60%	
Tm	55-65°C	
	正反向引物 Tm 值差别不能太大	
引物序列	3' 末端不能含有连续的 3 个 G 或 C	这可能会导致退火特异性降低，产生非特异性产物，例如引物二聚体
	3' 末端不能为 T	这会引起退火时的错配，降低反应特异性
互补序列	避开引物内部或引物之间 3' 末端有 2 个或以上的互补序列	这会形成引物二聚体
特异性	使用 BLAST 检索确认引物的特异性*	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

*Takara 可以根据客户的要求提供引物或 Cycling 探针的设计以及合成服务，也可以对使用 Cycling Probe 和 Smart Cycler System 进行扩增反应的体系提供优化服务，例如 SNP 检测系统。详情请联系 Takara。

● 参考文献

F. Bekkaoui, *et al. BioTechniques*. (1996) **20**: 240–248.

● 关联产品

CycleavePCR™ Reaction Mix (Code No. CY505A/B)

Probe qPCR Mix (Code No. RR391A/B)

TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B)

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

CycleavePCR and *Premix Ex Taq* 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>

v202206Da