

Code No. R075A

研究用

TAKARA

MightyAmp™ for Real
Time (TB Green® Plus)

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	2
● 试剂盒特长	2
● 使用注意	2
● 操作方法	3
● PCR 反应条件说明	6
● 进行 RT-PCR 反应时的实验方法	7
● 实验例	8
● 关联产品	11

● 制品说明

本制品是采用嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。含有 Real Time PCR 反应检测用的最适浓度 TB Green，是一种 2X Premix Type 试剂，进行实验时，PCR 反应液的配制十分方便简单。本制品中使用了 Takara 开发的一种具有高反应性能的 MightyAmp DNA Polymerase，适合于对粗提样品和高 GC 含量（超过 70%）样品进行定量 PCR 反应，同时可以使用常规 PCR 引物对 300 bp~2 kb DNA 片段进行定量 PCR 分析。使用本制品，还可以提高 Real Time PCR 反应相对困难的实验体系的 PCR 反应性能。

注意：本制品是作为特殊用途而开发的产品，对于标准样品的定量 PCR 反应请使用 TB Green Premix 系列的制品（Code No. RR420A/RR820A/RR430A/RR091A/RR071A）。

适用的 Real Time PCR 扩增仪

- 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)
- Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- LightCycler (Roche Diagnostics)

● 试剂盒原理

本制品使用了性能很强的 MightyAmp DNA Polymerase 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。

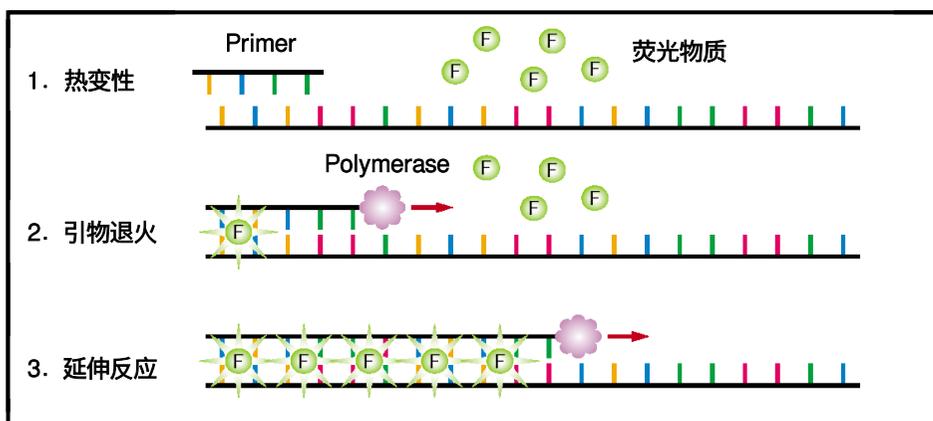
【PCR】

PCR 法是从微量 DNA 中扩增目的基因片段的技术。DNA 的热变性、引物的退火、DNA 聚合酶引导的延伸 3 个步骤为一个循环，反复操作即可在短时间内完成对目的基因片段 100 万倍以上的扩增。本制品使用的 MightyAmp DNA Polymerase 在 98℃ 以下时聚合酶活性受单克隆抗体抑制，故采用 Hot Start PCR。

【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，可以对目的基因进行准确定量，同时还可以测定扩增的目的 DNA 片段的融解温度。



● 制品内容 (50 μl 反应×200 次)

MightyAmp for Real Time (TB Green Plus) (2X conc.) *1	1.0 ml×5 支
ROX Reference Dye (50X conc.) *2	200 μl×1 支
ROX Reference Dye II (50X conc.) *2	200 μl×1 支

*1 内含 MightyAmp DNA Polymerase, dNTP Mixture, Mg²⁺, TB Green 等。

*2 使用在Applied Biosystems的Real Time PCR扩增仪上, 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 使用ROX Reference Dye, Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 使用ROX Reference Dye II。Thermal Cycler Dice Real Time System系列 (Code No. TP900/TP960/TP700/TP760: 终卖)、LightCycler (Roche Diagnostics) 等Real Time PCR扩增仪不必使用。

试剂盒外必备的主要试剂和仪器

1. Real Time PCR 用扩增仪 (authorized instruments)
2. 专用 tube 及 plate
3. PCR 用 primer
4. 灭菌水
5. 微量移液枪及 tip (高压灭菌处理)

● 保 存:

4°C可保存 6 个月。

避光保存, 避免污染。

长期保存请置于-80°C, 勿存于-20°C。产品融解后请于 4°C保存, 并在 6 个月内用完。

● 试剂盒特长

1. 适用于 Real Time PCR 反应, 可以快速、准确地对目的基因进行检测和定量。
2. 在 2X Premix 中, 预先混有 TB Green, PCR 反应液配制时, 只需加入模板、引物、灭菌水便可进行 Real Time PCR 反应, 操作简单方便。
3. DNA 聚合酶使用了反应性能很强的 MightyAmp DNA Polymerase, 对于以下以前难以扩增的情况, 使用本试剂进行 Real Time PCR 反应, 性能可能会得到改善。
 - 使用粗提后纯度较低的样品。
 - 扩增目的片段 GC 含量超过 70%。
 - 使用常规 PCR 引物对 300 bp~2 kb DNA 片段直接进行定量 PCR 反应。

● 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. 使用时请上下颠倒轻轻均匀混合, 避免起泡, 否则影响反应性能。不要涡旋混匀。
另外, MightyAmp for Real Time (TB Green Plus) (2X conc.) -80°C保存时, 可能会产生白色或淡黄色沉淀。可用手握缓慢融解, 或于室温短时间避光放置, 轻轻上下颠倒混匀至沉淀完全溶解。
沉淀会导致溶液成分不均匀, 使用前务必充分混匀试剂。
2. 配制反应液时, 试剂请于冰上放置。
3. 本制品中含有荧光染料 TB Green, 保存制品或配制 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。

● 操作方法

◆ 应用 Thermal Cycler Dice Real Time System 系列扩增仪的操作方法

请按照各仪器的使用说明书进行实验操作。

① 按下列组份配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	使用量	终浓度
MightyAmp for Real Time (TB Green Plus) (2X)	12.5 μ l	1X
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}
DNA 模板 (<100 ng) ^{*2}	2 μ l	
灭菌水	9.5 μ l	
Total	25 μ l ^{*3}	

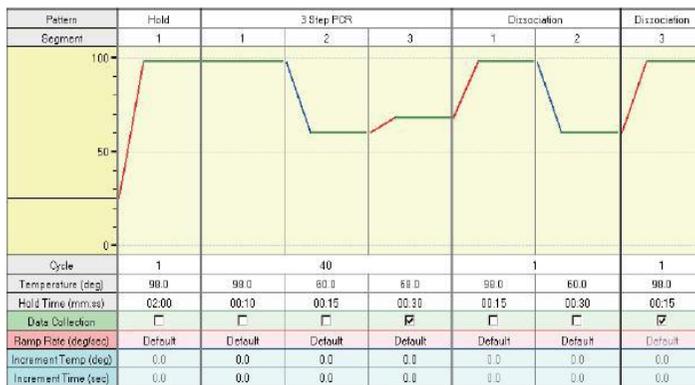
*1 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

*2 因不同种类 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定合适的 DNA 模板添加量。DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。另外，RT-PCR 时，cDNA (RT 反应液) 作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

*3 建议反应液体积为 25 μ l。

② 进行 Real Time PCR 反应。

建议采用下列图表显示的标准 PCR 反应程序。有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件说明」。



PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性

Cycle: 1

98°C 2 分钟

Stage 2: PCR 反应

Cycle: 40

98°C 10 秒

60°C 15 秒

68°C 1 分钟/kb^{*4}

Stage 3: Dissociation

*4: 500 bp 以下为 30 秒

◆ 特别提示：

本制品中的 MightyAmp DNA Polymerase 是抗性很强的 Hot Start 酶，在 PCR 反应前需要进行 98°C 2 min 初期变性，使抗体失活。

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。

解析方法请参考 Real Time PCR 仪器的说明书。

◆ 应用 Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR System 的操作方法

请按照各仪器使用说明书要求进行实验操作。

① 按下列组份配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	使用量	使用量	终浓度
MightyAmp for Real Time (TB Green Plus) (2X)	10 μ l	25 μ l	1X
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}
ROX Reference Dye (50X) or ROX Reference Dye II (50X) ^{*3}	0.4 μ l	1 μ l	1X
DNA 模板 ^{*2}	2 μ l	4 μ l	
灭菌水	6.8 μ l	18 μ l	
Total	20 μ l ^{*4}	50 μ l ^{*4}	

*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 因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定合适的 DNA 模板添加量。DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。另外，RT-PCR 时，cDNA (RT 反应液) 作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

*3 ROX Reference Dye II (50X) 比 ROX Reference Dye (50X) 浓度低，使用 7500 /7500 Fast Real-Time PCR System 时，请使用 ROX Reference Dye II (50X)。使用 StepOnePlus 时，请使用 ROX Reference Dye (50X)。

*4 按照各仪器推荐体系配制反应液。

② 进行 Real Time PCR 反应。

建议采用标准 PCR 反应程序，有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件说明」。

< Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System、StepOnePlus >

PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性

Reps: 1

98°C 2 分钟

Stage 2: PCR 反应

Reps: 40

98°C 10 秒

60°C 15 秒

68°C 1 分钟/kb

(500 bp 以下 30 秒)

Dissociation Stage

<7500 Fast Real-Time PCR System >

Stage 1: 预变性

Reps: 1

98°C 2 分钟

Stage 2: PCR 反应

Reps: 40

98°C 10 秒

60°C 15 秒

68°C 1 分钟/kb (500 bp 以下 30 秒)

Melt Curve Stage



◆特别提示:

本制品中的 MightyAmp DNA Polymerase 是抗性很强的 Hot Start 酶，在 PCR 反应前需要进行 98 °C 2 min 初期变性，使抗体失活。

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。解析方法请参考 Real Time PCR 仪器的说明书。

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

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

① 按下列组份配制 PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

试剂	使用量	终浓度
MightyAmp for Real Time (TB Green Plus) (2X)	10 μ l	1X
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}
模板 (<100 ng) *2	2 μ l	
灭菌水	7.2 μ l	
Total	20 μ l	

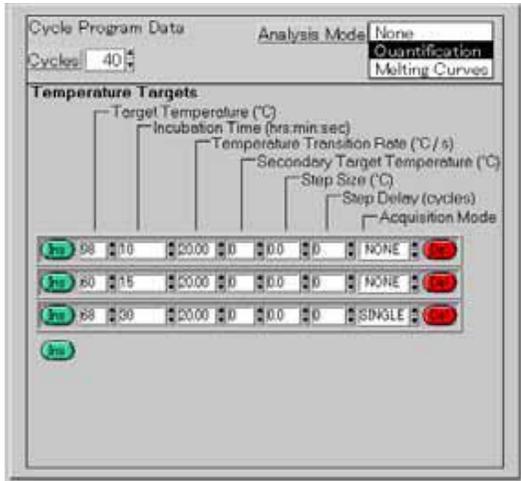
*1 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

*2 因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定合适的 DNA 模板添加量。DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。另外，RT-PCR 时，cDNA(RT 反应液)作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

② 进行 Real Time 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标准 PCR 反应程序，有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件说明」。

PCR 扩增标准程序:



- Stage 1: 预变性
 - 98°C 2分钟 20°C/秒
 - 1 Cycle
- Stage 2: PCR 反应
 - 98°C 10秒 20°C/秒
 - 60°C 15秒 20°C/秒
 - 68°C 1分钟/kb 20°C/秒
 - (500 bp 以下 30秒)
 - 40 Cycles
- Stage 3: 融解曲线分析
 - 95°C 0秒 20°C/秒
 - 65°C 15秒 20°C/秒
 - 95°C 0秒 0.1°C/秒

◆特别提示:

本产品中的 MightyAmp DNA Polymerase 是抗性很强的 Hot Start 酶, 在 PCR 反应前需要进行 98°C 2 min 初期变性, 使抗体失活。

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。解析方法请参考 Real Time PCR 仪器的说明书。

● PCR 反应条件说明

【初期变性】

本产品中的 MightyAmp DNA Polymerase 是抗性很强的 Hot Start 酶, 在 PCR 反应前需要进行 98°C 2 min 初期变性, 使抗体失活。

【PCR 条件讨论】

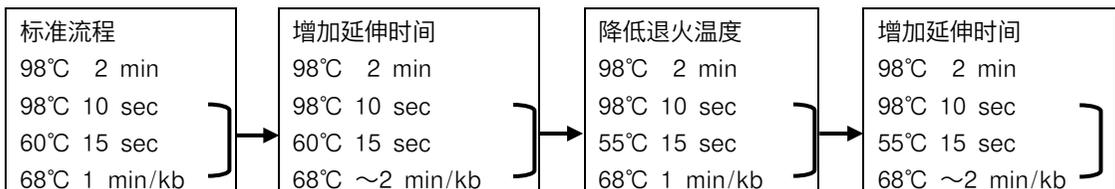
① 提高反应特异性

提高退火温度有时会提高反应特异性。同时考虑扩增效率, 对其反应条件进行优化。



② 提高扩增效率

增加延伸时间或者降低退火温度有时会改善扩增效率。



● 进行 RT-PCR 反应时的实验方法

进行 RT 反应时, 请使用 PrimeScript™ RT reagents Kit (Code No. RR037A/B、RR036A/B、RR047A/B) 和本制品组合使用能够得到可信度高的结果。以下为 PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A) 的使用例。

- 按下列组份配制 RT 反应液 (反应液请在冰上配制)。
RNA 样品以外的组份配制分装后, 再加入 RNA 样品。

试剂	使用量	最终浓度
5X PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 μ l	1X
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μ l	
Random 6 mers (100 μ M) *1	0.5 μ l	50 pmol
Oligo dT Primer (50 μ M) *1	0.5 μ l	25 pmol
Total RNA		
RNase Free dH ₂ O		
Total	10 μ l*2	

*1 Random 6 mers 和 Oligo dT Primer 同时使用, 可有效地将全长 mRNA 反转录成 cDNA。使用单引物进行反转录时, 使用量分别如下:

Random 6 mers (100 μ M) 0.5 μ l (50 pmol)

Oligo dT Primer (50 μ M) 0.5 μ l (25 pmol)

Specific Primer (2 μ M) 0.5 μ l (1 pmol)

*2 反应体积可按需求相应放大, 10 μ l 的反应体系可最大使用 500 ng 的 Total RNA。

- 反转录反应条件如下:

37°C 15 min (反转录反应) *3

85°C 5 sec (反转录酶的失活反应)

4°C

*3 使用 Gene Specific Primer 时, 建议反转录反应条件设置为 42°C 15 min。PCR 反应有非特异扩增时, 将温度升至 50°C 会有所改善。

- 按下列组份配制 PCR 反应液 (反应液请在冰上配制)。(使用 Thermal Cycler Dice Real Time System) 以下组份以 22.5~24 μ l 分装。

试剂	使用量	最终浓度
MightyAmp for Real Time (TB Green Plus) (2X)	12.5 μ l	1X
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M
灭菌水	X μ l	
Total	22.5-24 μ l	

- 将上述 PCR 反应液加入 Real Time PCR 用反应管中, 然后再加入 1~2.5 μ l* 的 RT 反应液 (或 RT 反应的稀释液), 保证最终反应体积为 25 μ l。

* PCR 反应时 RT 反应液加入量在 2.5 μ l 以下。

● 实验例

实验 1: 使用粗提样品进行 Real Time PCR 反应

[方法]

取 13.4 mg 牛肉和 10.5 mg 小鼠胰脏组织加入到 180 μ l 的 50 mM NaOH 中, 进行 95°C 10 分钟热处理后, 加入 20 μ l 的 1 M Tris-HCl (pH8.0) 进行中和, 将得到的处理液原液、4 倍稀释液、16 倍稀释液各取 1.5 μ l 作为模板进行 *cox1* 基因 (289 bp) 以及 *Hbb-b1* 基因 (165 bp) 的扩增。使用本制品与 TB Green *Premix Ex Taq*TM (Perfect Real Time) (Code No. RR041A, 终卖)* 同时进行 Real Time PCR 反应, 对其反应性能进行比较。

*: TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A/B) 升级前的产品。

[结果]

本制品对各浓度粗提样品都有良好的扩增, 而以往制品由于受到样品中阻害物的影响, 高浓度样品扩增性不好。本制品对于 PCR 阻害物含量多的样品进行 Real Time PCR 时可以得到高感度检出。

TB Green *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time)
RR041A

MightyAmp for Real Time (TB Green Plus)
本制品 (R075A)

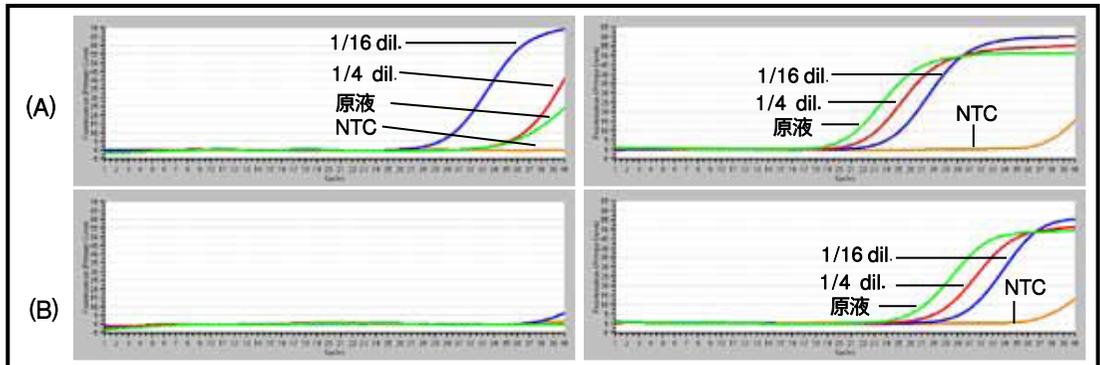


图 1: 使用粗提样品进行 Real Time PCR 的结果

试剂: TB Green *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time)

MightyAmp for Real Time (TB Green Plus)

装置: Thermal Cycler Dice Real Time System

反应条件: RR041A

95°C 30 秒→95°C 5 秒 / 60°C 30 秒; 40 Cycles

R075A

98°C 2 分钟→98°C 10 秒 / 60°C 15 秒 / 68°C 30 秒; 40 Cycles

Sample: (A) 牛肉碱裂解液

(B) 小鼠胰脏碱裂解液

目的基因: (A) *cox1*

(B) *Hbb-b1*

实验例 2: 对 GC 含量超过 70% 的目的基因进行 Real Time PCR 反应

[方法]

以 cDNA 和人基因组 DNA 为模板, 使用本制品和 TB Green *Premix Ex Taq* GC (Perfect Real Time) (Code No. RR071A) 以及 TB Green *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time) (Code No. RR041A, 终卖)* 对 GC 含量超过 70% 的 4 个目的基因进行 Real Time PCR 检出, 对其反应性能进行比较。

*: TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A/B) 升级前的产品。

[结果]

使用 TB Green *Premix Ex Taq* GC (Perfect Real Time) 和 TB Green *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time) 对 GC 含量超过 70% 的 4 个目的基因不能进行扩增, 使用本制品可以进行扩增。

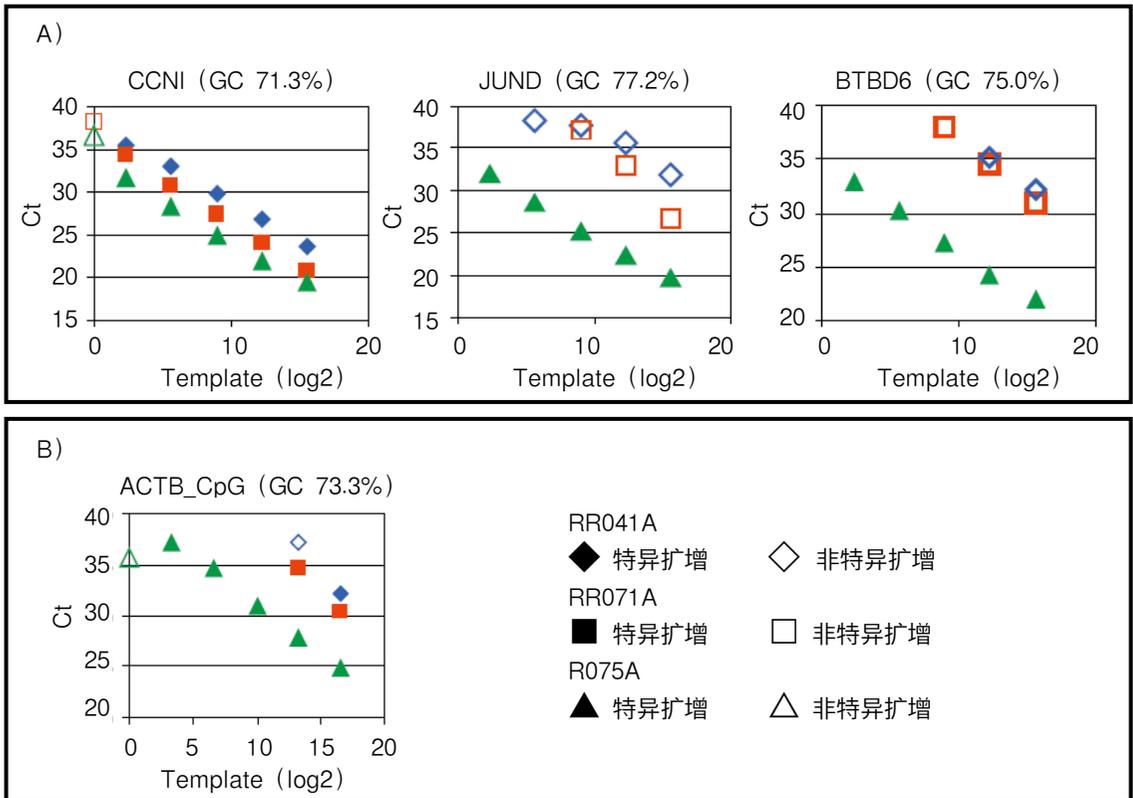


图 2. GC 含量超过 70% 的目的基因的 Real Time PCR 反应结果

试剂：TB Green *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time)
TB Green *Premix Ex Taq* GC (Perfect Real Time)
MightyAmp for Real Time (TB Green Plus)

装置：Thermal Cycler Dice Real Time System

反应条件：RR041A

95°C 30 秒 → 95°C 5 秒 / 60°C 30 秒; 40 Cycles

RR071A

95°C 30 秒 → 95°C 5 秒 / 60°C 30 秒; 40 Cycles

R075A

98°C 2 分钟 → 98°C 10 秒 / 60°C 15 秒 / 68°C 30 秒; 40 Cycles

模板：(A) cDNA (Human Testis Total RNA 5 pg~50 ng 相当量)

(B) Human Genomic DNA 10 pg~100 ng

目的基因：(A) CCNI (115 bp)、BTBD6 (168 bp)、JUND (167 bp)

(B) ACTB_CpG (131 bp)

实验例 3: 使用常规 PCR 引物直接进行 Real Time PCR 反应

[方法]

以人基因组 DNA 为模板, 使用常规 PCR 引物对 550 bp, 985 bp 和 1,954 bp 片段进行 Real Time PCR 扩增, 对其反应性能进行评价。

[结果]

对于使用以前制品难以扩增的 300 bp 以上的目的基因, 使用本制品在常规 PCR 反应条件下 (延伸时间 1 min/kb) 可以进行定量反应。

想使用常规 PCR 引物 (目的基因: ~2 kb) 和反应条件进 Real Time PCR 检测时, 推荐使用本制品, 可能会得到很好结果。

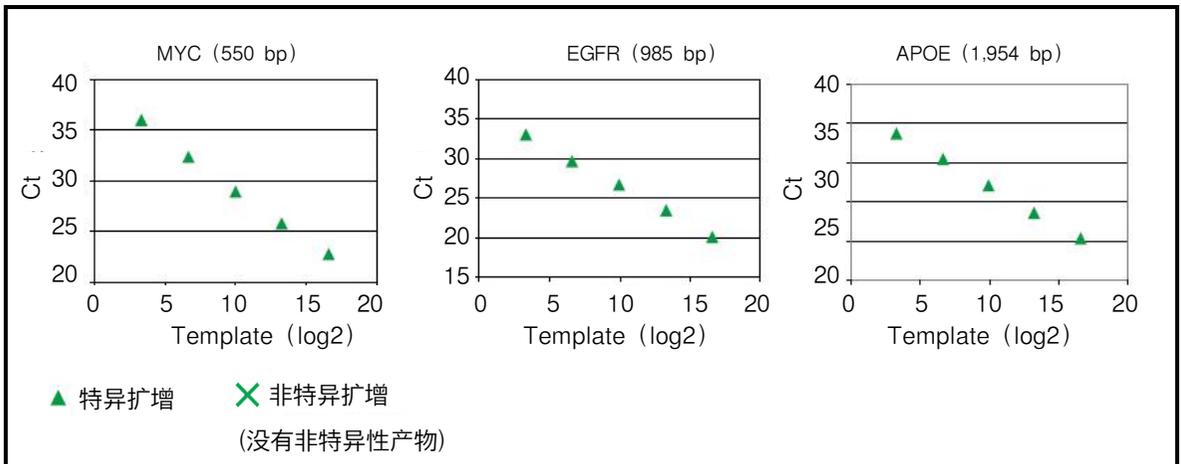


图 3. 使用常规 PCR 引物直接进行 Real Time PCR 反应的结果 (扩增片段: 500 bp-2 kb)

试剂: MightyAmp for Real Time (TB Green Plus)

装置: Thermal Cycler Dice Real Time System

反应条件: (MYC/550 bp)

98°C 2 分钟→98°C 10 秒 / 60°C 15 秒 / 68°C 30 秒; 40 Cycles

(EGFR/985 bp)

98°C 2 分钟→98°C 10 秒 / 60°C 15 秒 / 68°C 60 秒; 40 Cycles

(APOE/1,954 bp)

98°C 2 分钟→98°C 10 秒 / 60°C 15 秒 / 68°C 120 秒; 40 Cycles

模板: Human Genomic DNA 10 pg~100 ng

● 关联产品

TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420Q/A/B)

TB Green[®] Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B)

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

TB Green[®] Premix DimerEraser[™] (Perfect Real Time) (Code No. RR091A/B)

TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] GC (Perfect Real Time) (Code No. RR071A/B)

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

PrimeScript[™] RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036A/B)

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

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

Probe qPCR Mix (Code No. RR391A/B)

TB Green is a registered trademark of Takara Bio Inc.

MightyAmp, Thermal Cycler Dice, PrimeScript, *Premix Ex Taq*, and DimerEraser 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>