

Code No. RR071A

研究用

---

**TAKARA**

TB Green<sup>®</sup> *Premix Ex Taq*<sup>™</sup> GC  
(Perfect Real Time)

---

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
● 附 录	9
● 关联产品	11

## ● 制品说明

TB Green *Premix Ex Taq* GC (Perfect Real Time) 是通过嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。本制品是 2x 浓度的 premix 型试剂，已预先添加好用于 Real Time 检测的适宜浓度的嵌合染料 TB Green。本制品通过添加辅助蛋白质和对反应液组分的改良，对 GC 含量在 60~70% 的 GC Rich 区域反应性和定量性大大提高（扩增长度：~200 bp）。使用本制品对 GC Rich 的模板不需要进行条件优化即可以进行高准确度检出。另外，对 GC 含量在 60% 以下的普通模板也具有良好的扩增性能，可以在同一条件下对高 GC 含量模板和普通模板同时进行定量反应。

<本制品适用的 Real Time PCR 扩增仪>

- Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
- Thermal Cycler Dice Real Time System II (Code No. TP900/TP960: 终卖)
- Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (Code No. TP700/TP760: 终卖)
- Smart Cycler System/ Smart Cycler II System (Cepheid)
- Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- LightCycler/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics) 等

## ● 试剂盒原理

本制品使用了改良后的 *TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> 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。

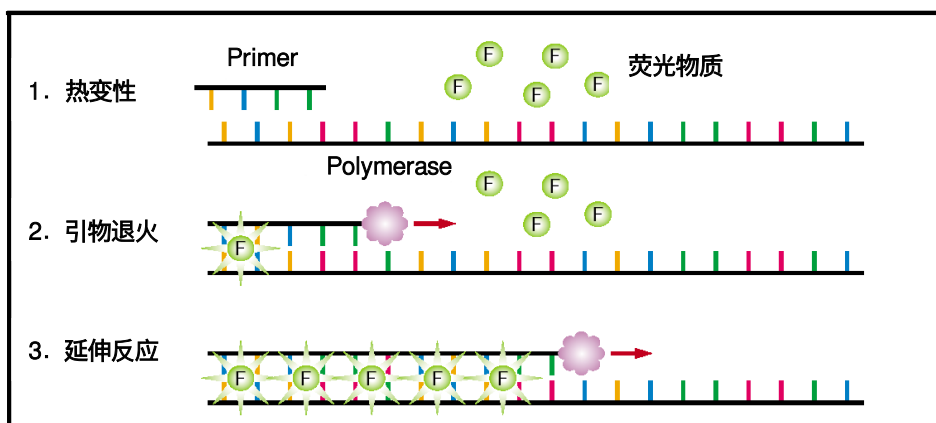
### 1. PCR

PCR 法是以微量的 DNA 为模板，对目的基因进行特异性扩增的技术。由模板热变性、引物退火、DNA 聚合酶延伸反应构成一个循环，重复这个循环，可以在几个小时内把目的 DNA 扩增 100 万以上。本制品中的 DNA 聚合酶采用了比 *Taq* 酶扩增效率更高的 *TaKaRa Ex Taq* HS，可以在更短时间内进行高灵敏度的检出，并能有效防止在热循环前由引物错配或引物二聚体产生的非特异性扩增。

### 2. 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 的荧光强度，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 $\mu$ l 反应 $\times$ 200 次)

TB Green <i>Premix Ex Taq</i> GC (Perfect Real Time) (2X Conc.) *1	1.0 ml $\times$ 5
ROX Reference Dye (50X Conc.) *2	200 $\mu$ l
ROX Reference Dye II (50X Conc.) *2	200 $\mu$ l

\*1 内含 *TaKaRa Ex Taq* HS, dNTP Mixture, Mg<sup>2+</sup>, TB Green 等。

\*2 于 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。

### ◆ 使用 ROX Reference Dye

StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

### ◆ 使用 ROX Reference Dye II

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

### ◆ 不必使用的扩增仪

Thermal Cycler Dice Real Time System series

(Code No. TP950/TP970/TP980/TP990, TP900/TP960/TP700/TP760: 终卖)

LightCycler (Roche Diagnostics)

Smart Cycler System (Cepheid)

## 试剂盒外必备的主要试剂及仪器

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

\*3: Real Time PCR 用引物设计可参照“引物设计说明”。

## ● 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、定量。
2. 在 2X 浓度的 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 聚合酶使用了改良后的 *TaKaRa Ex Taq* HS, 可以进行 Hot Start 法 PCR 反应, 有效防止热循环反应前由引物非特异性退火引起的非特异性扩增。同时通过添加辅助蛋白和对反应液组分的改良, 对 GC 含量在 60~70% 的 GC Rich 区域的反应性和定量性大大提高 (扩增长度: ~200 bp)。

## ● 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. 使用时请上下颠倒轻轻均匀混合, 避免起泡, 并经轻微离心后使用。如果试剂没有混匀, 其反应性能会有所下降。但请不要使用振荡器混匀。

另外, TB Green *Premix Ex Taq* GC (Perfect Real Time) (2X conc.) -80°C 保存时, 可能会产生白色或黄白色沉淀。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，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 series 扩增仪的操作方法

**注意：**请按照 Thermal Cycler Dice Real Time System 仪器说明书操作。

① 按下列组分配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	使用量	终浓度
TB Green Premix Ex Taq GC (2X)	12.5 $\mu$ l	1X
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M*1
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M*1
Template (<100 ng)	2 $\mu$ l	*2
灭菌水	9.5 $\mu$ l	
Total	25 $\mu$ l*3	

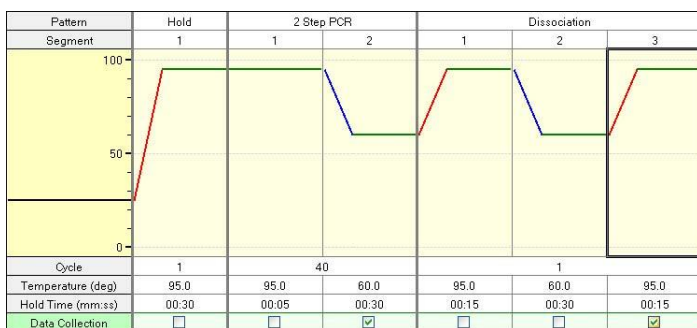
\*1 通常引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0  $\mu$ M 范围内调整引物浓度。

\*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 建议反应液体积为 25  $\mu$ l。

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。由于使用 Tm 值较低的引物等原因，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。有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件说明」



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 秒

Stage 3: Dissociation

◆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 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 7500/7500 Fast Real-Time PCR System/StepOnePlus Real-Time PCR System 扩增仪的操作方法

**注意:** 请按照各仪器使用说明书要求进行实验操作。

① 按下列组分配制 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
TB Green Premix Ex TaqGC (2X)	10.0 $\mu$ 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>
ROX Reference Dye (50X) or ROX Reference Dye II (50X) <sup>*2</sup>	0.4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1X
Template	2.0 $\mu$ l	4 $\mu$ l	<sup>*3</sup>
灭菌水	6.8 $\mu$ l	18 $\mu$ l	
Total	20.0 $\mu$ l <sup>*4</sup>	50 $\mu$ l <sup>*4</sup>	

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

\*2 ROX Reference Dye II (50X) 比 ROX Reference Dye (50X) 浓度低, 使用 7500 Real-Time PCR System 和 7500 Fast Real-Time PCR System 时, 请使用 ROX Reference Dye II (50X); 使用 StepOnePlus 进行分析时, 请使用 ROX Reference Dye (50X)。

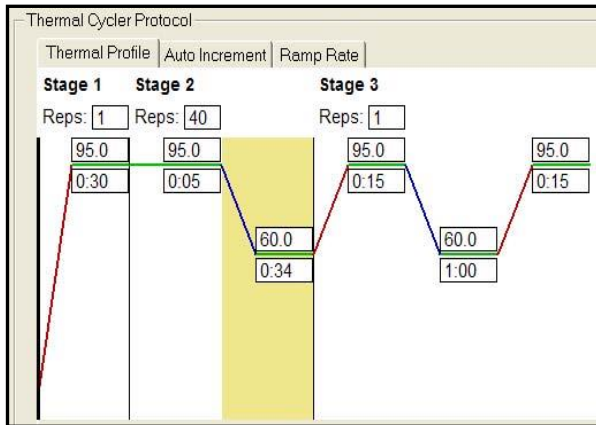
\*3 因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同, 必要时可进行梯度稀释, 确定合适的 DNA 模板添加量。DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。另外, RT-PCR 时, cDNA (RT 反应液) 作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

\*4 按照各装置的推荐体系配制反应液。

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。由于使用  $T_m$  值较低的引物等原因, 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。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 >



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

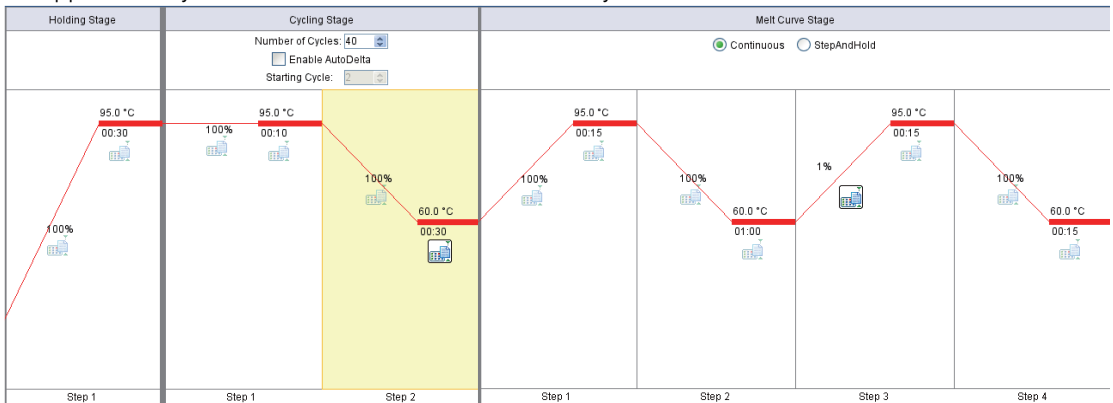
60°C 30 or 34 秒<sup>\*5</sup>

Stage 3: Melt Curve

\*5 使用 StepOnePlus 时请设定在 30 秒。

使用 7500 时请设定在 34 秒。

<Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System>



两步法 PCR 扩增标准程序:

Stage 1: 预变性

Number of Cycles: 1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Number of Cycles: 40

95°C 10 秒

60°C 30 秒

Stage 3: Melt Curve

◆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 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 Smart Cyclor II System Real Time PCR 扩增仪的操作方法

① 按下列组分配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	使用量	终浓度
TB Green Premix Ex TaqGC (2X)	12.5 $\mu$ l	1X
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M*1
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M*1
Template (<100 ng)	2 $\mu$ l	*2
灭菌水	9.5 $\mu$ l	
Total	25 $\mu$ l	

\*1 通常引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0  $\mu$ 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 反应管用离心机轻轻离心后放入 Smart Cyclor II System 中进行 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。有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件说明」。

Stage 1			Stage 2				Stage 3			
Hold			Repeat 40 times.				Melt Curve			
Temp	Secs	Optics	2-Temperature Cycle				Start	End	Optics	Deg/Sec
95.0	30	Off	Deg/Sec	Temp	Secs	Optics	60.0	98.0	Ch1	0.2
			NA	95.0	10	Off				
			NA	60.0	30	On				
			<input type="checkbox"/> Advance to Next Stage							

两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性

Hold

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Repeat: 45 times

95°C 10 秒

60°C 30 秒

Stage 3: Melt Curve

◆ 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 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 LightCycler/LightCycler 480 Real Time PCR 扩增仪的操作方法

请按照仪器使用说明书要求进行实验操作。

① 按下列组分配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。



试剂	使用量	终浓度
TB Green Premix Ex TaqGC (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
Template (<100 ng)	2.0 $\mu$ l	*2
灭菌水	7.2 $\mu$ l	
Total	20.0 $\mu$ l	

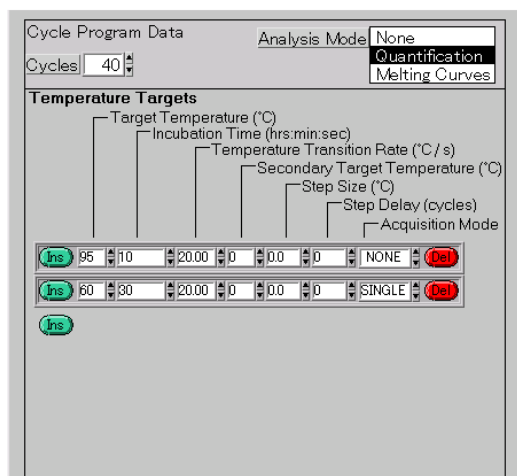
\*1 通常引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0  $\mu$ M 范围内调整引物浓度。

\*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。有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件说明」。

<LightCycler>



两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性

95°C 30 秒 20°C/秒

1 Cycle

Stage 2: PCR 反应

95°C 10 秒 20°C/秒

60°C 30 秒 20°C/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

<LightCycler 480 System>

两步法 PCR 扩增标准程序：

预变性

95°C 30 秒 (Ramp Rate 4.4°C/秒)

1 cycle

PCR

分析模式: 定量分析

95°C 5 秒 (Ramp Rate 4.4°C/秒)

60°C 30 秒 (Ramp Rate 2.2°C/秒, Acquisition Mode : Single)

40 cycles

## 融解

分析模式：融解曲线

95°C 5 秒 (Ramp Rate 4.4°C/秒)

60°C 1 分钟 (Ramp Rate 2.2°C/秒)

95°C (Ramp Rate 0.11°C/秒, Acquisition Mode : Continuous, Acquisitions : 5 per°C)

1 cycle

## 降温

50°C 30 秒 (Ramp Rate 2.2°C/秒)

1 cycle

### ◆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 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。

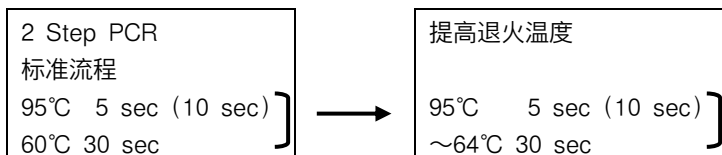
分析方法参见仪器的操作手册。

## PCR 反应条件说明

### 【PCR 条件的讨论】

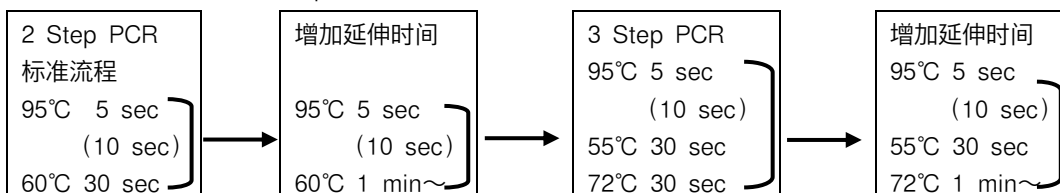
#### ① 要提高反应特异性

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 要提高扩增效率

可以增加延伸时间或变为 3 Step PCR 反应有时会改善扩增效率。



### 【预变性】

初期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 模板也能够很好地变性。如果想改变变性条件，可以延长至 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。

- ◆ PCR 扩增产物长度：80~150 bp 较为合适
- ◆ 设计引物要求如下：

引物长度	17~25 mers
GC 含量	40~60% (45~55%理想) *1
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 *2: 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	避免 GC rich 或 AT rich。 3' 末端碱基最好为 G 或 C。 尽量避免 3' 末端碱基为 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 BIAST 检索确认引物的特异性*3。

\*1 使用本制品对 GC rich 的目标片段进行扩增时，设计为 45~65% (50~60%理想)。

\*2 OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights)

\*3 <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！

### (2) 进行 RT-PCR 反应时的实验方法

反转录反应使用

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)

与本制品组合使用，能得到良好的实验结果。以下为 PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A) 的使用例。

1. 按下列组分配制 RT 反应液（反应液请在冰上配制）。  
RNA 样品以外的组分配制分装后，再加入 RNA 样品。

试 剂	使用量	终浓度
5X PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 $\mu$ l	1X
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 $\mu$ l	
Oligo dT Primer (50 $\mu$ M) *1	0.5 $\mu$ l	25 pmol
Random 6 mers (100 $\mu$ M) *1	0.5 $\mu$ l	50 pmol
Total RNA		
RNase Free dH <sub>2</sub> O		
Total	10 $\mu$ 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  $\mu$ M)                      0.5  $\mu$ l (50 pmol)

Oligo dT Primer (50  $\mu$ M)                      0.5  $\mu$ l (25 pmol)

Gene Specific Primer (2  $\mu$ M)                0.5  $\mu$ l (1 pmol)

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

2. 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，反转录反应条件请使用 42°C 15 min。如果 Real Time PCR 反应有非特异性产物生成时，反转录温度提高至 50°C 对提高 PCR 反应特异性会有所改善。

3. 按下列组分配制 Real Time PCR 反应液（反应液请在冰上配制）。

试 剂	使用量	终浓度
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> GC (2X)	12.5 $\mu$ l	1X
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
灭菌水	x $\mu$ l	
Total	22.5~24 $\mu$ l	

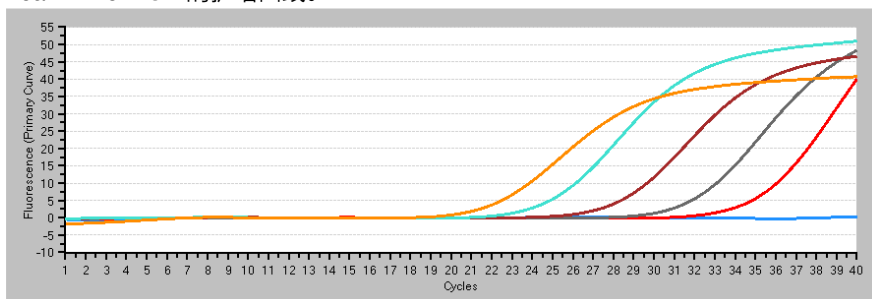
4. 将上述 PCR 反应液加入 Real Time PCR 用反应管中，然后再加入 2.5~1  $\mu$ l\*4 的 RT 反应液保证最终反应体积为 25  $\mu$ l。

\*4 RT 反应液的加入量不要超过 2.5  $\mu$ l。

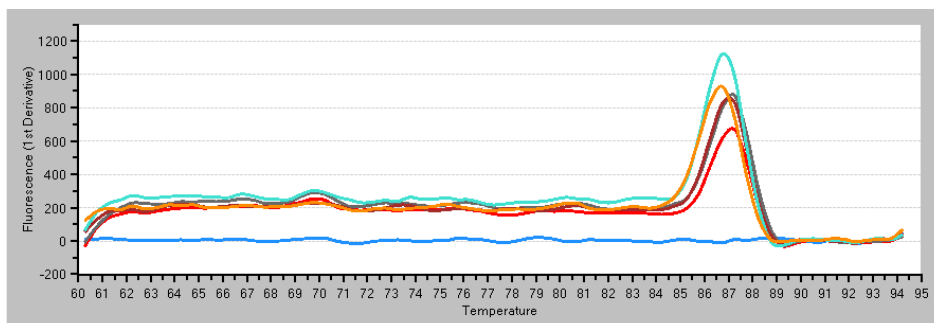
5. 实验结果例。

通过 RT-PCR 对 Human SYNGR3 mRNA 进行检出（扩增产物 GC 含量 63.5%），cDNA 量相当于 Total RNA 5 pg~50 ng。使用灭菌水做为 Negative Control 用模板。Real Time PCR 的扩增曲线、融解曲线、标准曲线如下图。

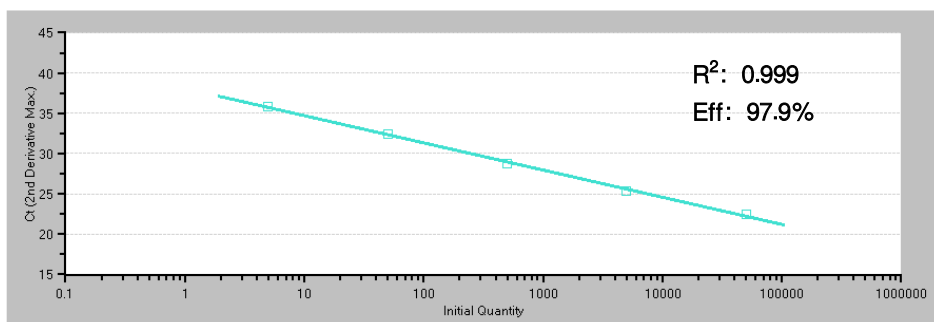
Real Time PCR 的扩增曲线。



Real Time PCR 的融解曲线。



Real Time PCR 的标准曲线。



## ● 关联产品

TB Green<sup>®</sup> Fast qPCR Mix (Code No. RR430S/A/B)

TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420Q/A/B)

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

TB Green<sup>®</sup> Premix DimerEraser<sup>™</sup> (Perfect Real Time) (Code No. RR091Q/A/B)

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

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

PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code No. RR047Q/A/B)

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

TB Green and *TaKaRa Ex Taq* are registered trademarks of Takara Bio Inc.  
PrimeScript, *Premix Ex Taq*, Thermal Cycler Dice, 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](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>