

Code No. RR393S

RR393A

研究用

TAKARA

Probe qPCR Mix
MultiPlus

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
● 操作注意	2
● 使用注意	3
● 操作方法	3
● 实验条件的选择	5
● 附录：关于引物和探针的设计	6
● 补充：关于区域划分	7
● 关联产品	7

● 制品说明

本制品是采用 5' -核酸酶法的探针检测专用 Real Time PCR (qPCR) 试剂。通过对添加了抗体的 Hot Start PCR 酶和 Real Time PCR 用 Buffer 分别进行了改良, 可以在宽广的动态范围内实现高速、高特异性扩增。此外, 对多个目的基因同时检出的反应 (multiplex), 实现高灵敏度、高定量性, 具有很好的再现性。

本制品是一种 2X 浓度的 Premix 型试剂, 试剂中已添加了 Tli RNaseH (耐热性 RNaseH) 和 Uracil-N-Glycosylase (UNG), 以 cDNA 为模板进行 PCR 反应时, Tli RNaseH 可以很好抑制由于 cDNA 中残存 mRNA 对 PCR 反应造成的阻害作用。另外, 通过进行 UNG 反应, 可降解之前使用该 Kit 扩增得到的 PCR 产物, 能够有效避免交叉污染造成的假阳性结果。

本制品适用的 Real Time PCR 扩增仪

Thermal Cycler Dice™ Real Time System IV (Code No. TP1000/TP1010/TP1030)

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)

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

QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.1/0.2 mL block (Thermo Fisher Scientific)

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

StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

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

● 试剂盒原理

本制品利用耐热性 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增反应, 通过使用探针对 PCR 扩增产物进行实时监测。

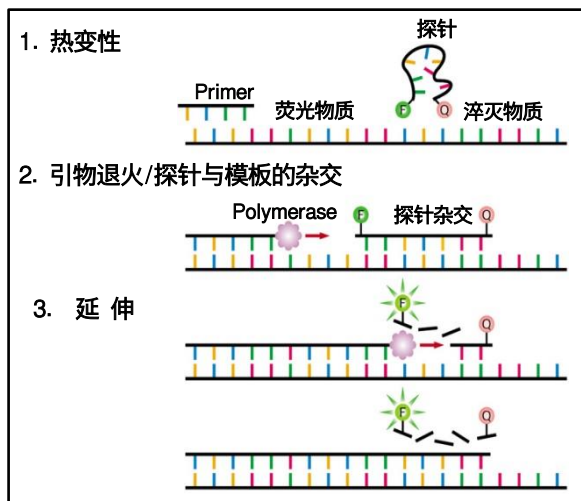
1. PCR

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。

2. 荧光检出

使用 5' 端带有荧光物质 (如: FAM 等), 3' 端带有淬灭物质 (如: TAMRA 等) 修饰的寡核苷酸进行荧光检测的方法。当探针完整时, 5' 端的荧光物质受到 3' 端淬灭物质的制约, 不能发出荧光。而当探针被分解后, 5' 端的荧光物质便会游离出来, 发出荧光。

当 PCR 反应液中加入荧光探针后, 在 PCR 反应的退火过程中, 荧光探针便会和模板杂交。进一步在 PCR 反应的延伸过程中, 耐热性 DNA 聚合酶的 5' →3' Exonuclease 活性可以分解与模板杂交的荧光探针, 游离荧光物质发出荧光。通过检测反应体系中的荧光强度, 可以达到检测 PCR 产物扩增量的目的。具体原理见右图。



● 制品内容 (RR393S, 25 μl 反应×80 次; RR393A, 25 μl 反应×400 次)

	RR393S	RR393A
Probe qPCR Mix MultiPlus (2×conc.) *1	1 ml	1 ml×5
ROX Reference Dye (50×conc.) *2	200 μl	200 μl
ROX Reference Dye II for RR393 (100×conc.) *2	200 μl	200 μl

*1 内含 PCR 酶, dNTP Mixture, Mg²⁺, Tli RNase H 和 UNG。

*2 使用在 Applied Biosystems 等 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 (50×) 的 PCR 仪 (使用时终浓度为 1×)

StepOnePlus Real-Time PCR System

◆ 使用 ROX Reference Dye II for RR393 (100×) 的 PCR 仪 (使用时终浓度为 1×)

QuantStudio 5 Real-Time PCR System

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System

◆ 不需要使用 ROX 的 PCR 仪

Thermal Cycler Dice Real Time System Series (Code No. TP1000/TP950/TP900 等)

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

CFX96 Real-Time PCR Detection System

● 试剂盒外必备主要试剂和仪器

1. Real Time PCR 扩增仪 (authorized instruments)
2. 实验专用反应管或反应板
3. PCR 引物
4. 检测用探针 (TaKaRa qPCR Probe 等)
5. 灭菌水
6. 微量移液器和枪头 (已高压灭菌)

● 保 存: -20℃

● 特 长

1. 探针检测用 2×Premix qPCR 试剂。
2. 通过 Hot Start PCR 酶和改良的 PCR 缓冲液进行快速反应。
3. 支持多个目的片段同时检测反应。
4. Tli RNaseH 和 UNG 可抑制 PCR 反应产生的假阳性。

● 操作注意

以下为使用本制品时的注意事项, 使用前请一定认真阅读。

1. 使用前, 请上下颠倒轻轻混合, 避免起泡, 混匀后再使用。如果试剂没有混匀, 其反应性能会有所下降。不能使用振荡器混匀。

Probe qPCR Mix MultiPlus (2×conc.) 在保存过程中有时会形成沉淀。此时, 轻轻用手握一会儿或室温短时间放置后, 颠倒混匀可以完全溶解。请确保试剂混合均匀后再使用。

2. 融解后的试剂请立即冰上放置。
3. 本制品中不包含探针, 请另行准备。

- 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。
- 如果样品和引物因混入核酸酶而被降解，则不能准确进行检测。实验者的汗液和唾液也会带入核酸酶，操作时应注意佩戴一次性手套和口罩。
- 建议从反应液的配制到模板 DNA 的添加，设定以下 3 个实验区域，并进行物理性隔离。（请参考“补充：关于区域划分”）
 区域 1：反应液的配制及分装。
 区域 2：制备模板 DNA。
 区域 3：将模板 DNA 添加到反应液中。
 本制品无需电泳等分析反应结束后的扩增产物。为了避免污染，严禁从 Tube 管中取出扩增产物。
- 各 Real Time PCR 扩增仪的分析方法请参见各仪器的使用说明书。如果分析软件中的校正功能不正确，则可能会导致结果判定错误。此时可参照 Real Time PCR 扩增说明书进行手动设定。

● 使用注意

怀疑存在 PCR 产物污染时，请在反应前增加 25°C 反应 2 min 的步骤。通过 UNG 的作用，降解先前反应产生的 PCR 产物。通常情况下，如果没有污染，不需要执行此步骤。

本制品中使用的 DNA 聚合酶是利用抗 *Taq* 抗体的 Hot Start PCR 酶，与其他公司的化学修饰型 Hot Start PCR 酶相比，不需要 PCR 反应前的 95°C、5–15 min 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、20 sec。

● 操作方法

注意：请按照各个仪器的使用说明书进行操作。

- 按下列组分配制 PCR 反应液。

< 1 个反应 >

试剂	使用量	终浓度
Probe qPCR Mix MultiPlus	12.5 μ l	1 \times
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}
Probe ^{*2}	1.0 μ l	
模板	2.0 μ l ^{*3}	
灭菌水	8.5 μ l	
Total	25.0 μ l	

【使用 ROX Reference Dye 时】

< 1 个反应 >

试剂	使用量	终浓度
Probe qPCR Mix MultiPlus	12.5 μ l	1 \times
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}
Probe ^{*2}	1.0 μ l	
ROX Reference Dye (50 \times)	0.5 μ l	1 \times
模板	2.0 μ l ^{*3}	
灭菌水	8.0 μ l	
Total	25.0 μ l	

【使用 ROX Reference Dye II for RR393 时】

<1 个反应>

试剂	使用量	终浓度
Probe qPCR Mix MultiPlus	12.5 μ l	1 \times
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}
Probe ^{*2}	1.0 μ l	
ROX Reference Dye II for RR393 (100 \times)	0.25 μ l	1 \times
模板	2.0 μ l ^{*3}	
灭菌水	8.25 μ l	
Total	25.0 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 范围内调整理想的引物浓度。

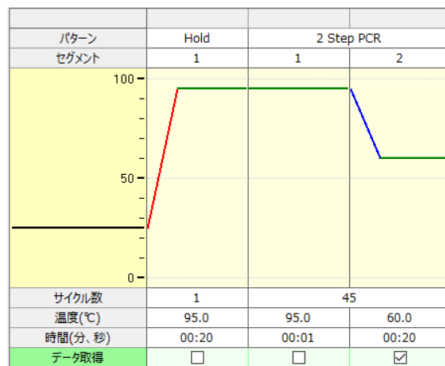
使用 2 个以上的引物组合时, 在初期研讨中也要使各引物的最终浓度达到 0.2 μ M。

*2: 使用的探针浓度, 根据使用的 Real Time PCR 扩增仪及探针的荧光标记物不同而不同, 请参照仪器说明书及探针附带的说明书调整探针使用量。使用两个或更多探针时, 请确保不会与其他滤光器发生串扰, 也不会发生交叉反应。使用 Thermal Cycler Dice Real Time System III 时, 通常探针终浓度在 0.1~0.5 μ M 范围内进行调整。

*3: 模板添加量因模板溶液中存在的靶基因的拷贝数不同而不同, 进行梯度稀释研讨适当的模板添加量。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。

建议采用下面图表显示的 Shuttle PCR 标准操作流程进行 PCR 反应。请先参考此程序, 然后根据需要进行优化 PCR 条件 (请参阅第 5 页的「PCR 条件的研讨」)。



Shuttle PCR 扩增标准程序

Hold: 预变性^{*4}

Cycle: 1
95°C 20 秒

2 step PCR

Cycle: 45
95°C 1 秒

60°C 20 秒^{*5}

*4: 如果怀疑 PCR 产物 (包括 dUTP) 污染, 可以在预变性之前进行 25°C 2 分钟的步骤。通过 UNG 的作用, 降解先前反应产生的 PCR 产物。

*5: 如果可以设置, 请先尝试 20 秒。某些仪器在检测多个波长时可能无法将延伸时间设置为 20 秒。在这种情况下, 请设置可设定的最短时间。

3. 反应结束后确认扩增曲线, 进行 PCR 定量时制作标准曲线。

● 实验条件的选择

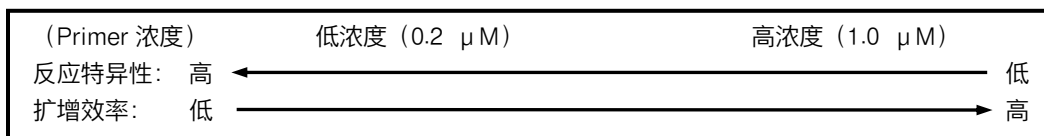
如果按照推荐的条件 (Shuttle PCR 扩增标准程序) 进行反应, 反应性能不好时, 请按照下面的方法进行引物和 PCR 反应条件的研讨。

实验条件选择时, 请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, 并可以在较大浓度范围内进行很好的定量。

- 反应特异性高的实验体系
 - 低浓度模板的 Ct 值稳定。
 - 低浓度模板检测时的荧光值降低小。
- 扩增效率高的实验体系
 - 扩增产物起峰更早 (Ct 值小)。
 - PCR 扩增效率高 (接近理论值 100%)。

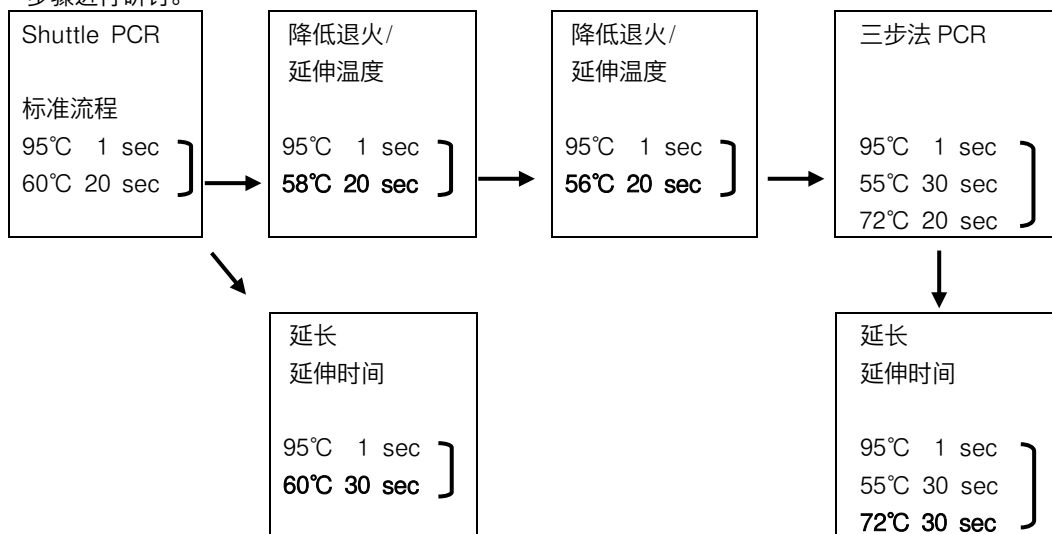
【引物浓度的研讨】

引物浓度与反应特异性和扩增效率之间存在以下关系。为了提高反应特异性, 要降低引物浓度, 为了提高扩增效率, 要提高引物浓度。

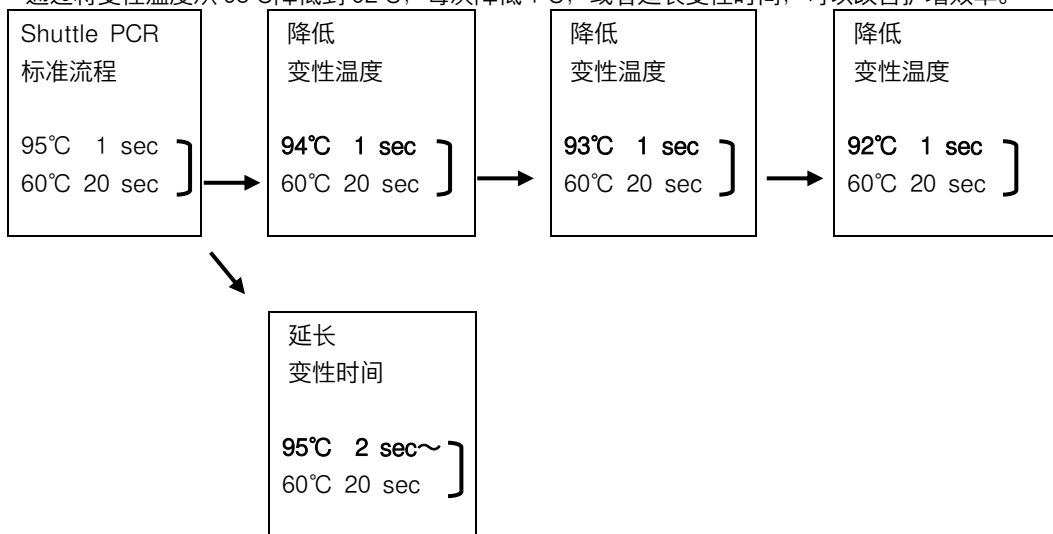


【PCR 条件的研讨】

- 提高扩增效率
- 1) 通过降低退火/延伸温度或改为 3 step PCR 或延长延伸时间, 可以提高扩增效率。请按照以下步骤进行研讨。

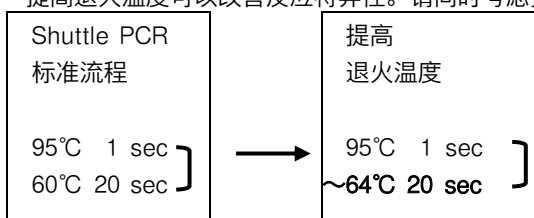


2) 通过将变性温度从 95°C 降低到 92°C，每次降低 1°C，或者延长变性时间，可以改善扩增效率。



○ 提高反应特异性

提高退火温度可以改善反应特异性。请同时考虑扩增效率进行研讨。



○ 预变性

预变性条件通常设定为 95°C 20 sec，使用此条件对于难变性的环状质粒 DNA 和基因组 DNA 模板基本上也能够很好地变性。如果对难变性的模板想改变变性条件，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：关于引物和探针的设计

为了有效地进行 Real time PCR，设计反应性能良好的引物和探针很重要。特别是在多重反应的情况下，由于反应液中存在多个引物和探针，因此有可能发生非目标区域被扩增检测的非特异性反应，或者即使是特异性的扩增产物，探针的荧光也可能被相邻的滤光器检测出荧光串扰。因此，设计引物和探针时应注意以下几点。

1. 不同引物组之间的 Tm 值，尽量接近。
2. 不同引物组之间，不要形成引物二聚体。
3. 请选择探针荧光染料的荧光波长相互重叠较小的组合。

另外，对于单重反应，推荐使用本公司在线检索&订购系统“Perfect Real Time 支持系统 for 探针法”^{*}，该系统可以设计人、小鼠、大鼠的基因表达分析用途的 Real Time RT-PCR 引物/探针。

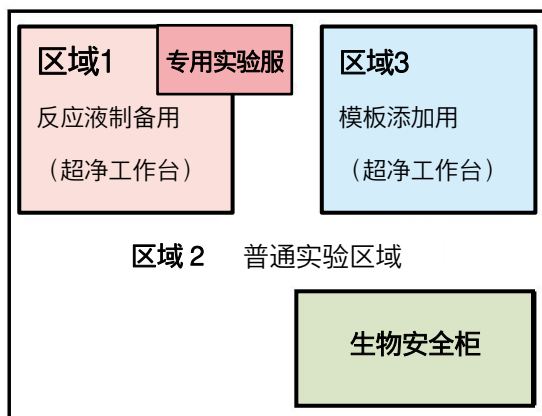
详情请参照本公司网站 (<https://www.takarabiomed.com.cn/>)。

^{*}：本公司以人、小鼠和大鼠的 RefSeq DataBase，已经设计完成了各基因用于 Real Time RT-PCR 的引物和探针套系。与本制品配合使用时，可进行探针法 Real Time RT-PCR。

使用本系统设计和合成 RT-PCR 引物时，可以使用 Shuttle PCR 标准流程进行反应。

※Takara 公司还为不支持“Perfect Real Time 支持系统 for 探针法”的基因提供了定制设计和合成服务。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！

●补充：关于区域划分



- 区域 1：反应试剂配制区域
进行 Real Time PCR 反应液的配制及分装。
(无模板操作区)
- 区域 2：普通实验区域
进行样品的处理及 DNA 的制备。
根据需要设置生物安全柜。
- 区域 3：处理高浓度 DNA 的区域
在分装完成的反应液中添加模板 DNA。
标准样品的稀释也在此进行。

● 关联产品

PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A/B)

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

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

PrimeScript™ FAST RT reagent Kit with gDNA Eraser (Code No. RR092S/A/B)

Probe qPCR Mix (Code No. RR391S/A/B)

Probe qPCR Mix, with UNG (Code No. RR392S/A/B)

One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG (Code No. RR601A/B)

Thermal Cycler Dice™ Real Time System IV (Code No. TP1000/TP1010/TP1030)

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

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

Thermal Cycler Dice, CronoSTAR, and PrimeScript 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>

v202311Da