

Code No. TCH006/TCH010

研究用

Takara

Fast Probe qPCR Mix, with UNG

中文名：探针法快速 qPCR 预混液，含 UNG

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 试剂原理	1
● 制品内容	1
● 试剂盒外必备主要试剂和仪器	2
● 保 存	2
● 特 长	2
● 操作注意	3
● 使用注意	3
● 操作方法	4
● 补充：关于区域划分	8
● 关联产品	9

● 制品说明

本制品是采用探针法进行 Real Time PCR (qPCR) 检测的快速试剂。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,可降低引物二聚体出现频率,具有扩增特异性高、检测灵敏度高等特点,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,可进行可信用度高的 Real Time PCR 分析。本制品在 2×Premix 试剂中已添加了 Tli RNaseH (耐热性 RNaseH),以 cDNA 为模板进行 PCR 反应时,可以很好抑制由于 cDNA 中残存 mRNA 对 PCR 反应造成的阻害作用。同时 Premix 中添加了 UNG (Uracil N-Glycosylase),通过进行 UNG 反应,可以降低之前使用该 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。此外,本制品对高 GC 含量的靶基因以及粗提样本也有很好的扩增性能。本制品是一种 2X 浓度的 Premix 型试剂,配制 PCR 反应液十分简便。

● 试剂原理

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。

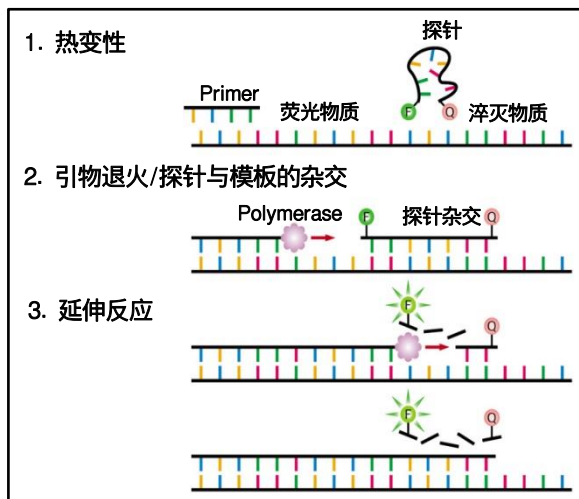
1. PCR

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 (TCH006: 50 μl 反应×200 次量; TCH010: 50 μl 反应×40 次量)

	TCH006	TCH010
Fast Probe qPCR mix (2X), with UNG ^{*1}	1 ml × 5	1 ml
ROX Reference Dye (50X Conc.) ^{*2}	200 μl	40 μl
ROX Reference Dye II (50X Conc.) ^{*2}	200 μl	40 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 (50X) 的 PCR 仪

StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆使用 ROX Reference Dye II (50X) 的 PCR 仪

7500 Fast Real-Time PCR System

Applied Biosystems™ QuantStudio 3/5 Real-Time PCR System (以上 Thermo Fisher Scientific)

◆ 不需要使用ROX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 //Lite (Code No. TP900/TP960、TP700/TP760: 终卖)

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

LightCycler 96/480 System (Roche Diagnostics)

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

Gentier 96E/96R 全自动医用 PCR 分析系统 (西安天隆科技)

● 试剂盒外必备主要试剂和仪器

1. Real Time PCR 扩增仪 (authorized instruments)

【本制品适用的机型】

- 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)
 - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
 - Applied Biosystems™ QuantStudio™ 3 / 5 Real Time PCR System、7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
 - LightCycler 96/480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics)
 - Gentier 96E/96R 全自动医用 PCR 分析系统 (西安天隆科技)
2. 实验专用反应管或反应板
3. PCR 引物
4. 检测用探针 (Dual Labeled Probe, etc.)
5. PCR 模板
6. 灭菌水
7. 微量移液器和枪头

● 保 存: -20℃

● 特 长

1. 快速的扩增能力: 支持快速反应程序, 可在 22 min 内 (仪器快速模式) 进行可信用度高的定量 PCR 分析, 提高检测效率。
2. 出色的扩增灵敏度: 性能出色的 Hot Start PCR 酶, 搭配精心优化的缓冲体系, 提高扩增灵敏度。
3. 强大的杂质耐受力: 对 PCR 阻害物抵抗性提高, 拓宽了前处理方法的简便化等使用用途; 在 2×Premix 试剂中, 预先添加了耐热性 Tli RNaseH (耐热性 RNaseH), 可以很好抑制以 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。
4. 平台通用: 适用于不同的 qPCR 仪器, 可兼容不同仪器的快速程序。
5. 操作简单方便: 本制品是一种 2X 浓度的 Premix 试剂, 只需要加入引物/探针、模板、灭菌水便可通过探针法进行 Real Time PCR 反应。
6. UNG 防污染检测系统: 添加 UNG (Uracil N-Glycosylase), 可以有效防止因 PCR 产物污染造成的假阳性结果。

● 操作注意

以下为使用本试剂时的注意事项，使用前请一定认真阅读。

1. 进行 Real Time RT-PCR 反应时，反转录反应所用的试剂推荐使用：
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. RR047Q/A/B)
PrimeScript FAST RT reagent Kit with gDNA Eraser (Code No. RR092A/RR092S)
以上制品与本制品组合使用可以得到可信用度高的结果。
2. 使用前，组分 Fast Probe qPCR Mix ,with UNG (2X)请上下颠倒轻轻混合，避免产生气泡，试剂混合均匀后再使用。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) Fast Probe qPCR Mix, with UNG (2X)于-20℃保存时，有时会形成沉淀。因此，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。确保试剂混合均匀后再使用。
3. 融解后的试剂请立即冰上放置。
4. 本制品中不含有探针，请另行准备。
5. 使用时，请一定保证所有的试剂、耗材没有污染，调制场所也要确保没有污染。
6. 试剂分取、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。
7. 本制品中不含有探针，请另行准备。
8. 如果探针、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。
9. 建议从反应液的配制到检测样品的添加，设定以下 3 个实验区域，并进行物理性隔离。
在各区域要避免开闭含有扩增产物的反应管。
区域 1：反应液的配制及分装。
区域 2：检测样品的制备。
区域 3：向反应液中添加检测样品，进行反应、检出。
由于本制品使用 Real Time PCR 法，扩增反应与检测同时进行，反应后的扩增产物不需要再进行电泳。为了避免污染，严禁从 Tube 管中取出扩增产物。
10. qPCR 反应管请与 Real Time PCR 扩增仪适配。
11. 各 Real Time PCR 扩增仪的分析方法请参见各仪器的使用说明书。当 Real Time PCR 扩增仪的 Auto 功能不适合时，将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，请增加 25℃反应 10 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，不需要进行 25℃反应 10 min 的操作步骤。

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℃、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℃、30 sec。

● 操作方法

[使用Thermal Cycler Dice Real Time System III、Thermal Cycler Dice Real Time System IV、CronoSTAR 96 Real-Time PCR System、CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System、LightCycler 480 Real-Time PCR Detection System、Gentier 96E/96R 全自动医用PCR分析系统时的操作方法]

注意：请按照仪器的使用说明书进行操作。

1. 按照下列组分配制PCR反应液（反应液配制，请在冰上进行）。

<1个反应>

试剂	使用量 ^{*6}	终浓度
Fast Probe qPCR Mix, with UNG (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}
Probe ^{*2}	1 μ l	
Template ^{*3}	2 μ l	
灭菌水	up to 25 μ l	

2. 开始Real Time PCR反应。

PCR反应管请用离心机轻轻离心后放入Real Time PCR Detection System中进行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。

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。

有关PCR的具体反应条件请参照「PCR反应条件概述」。

Shuttle PCR标准操作流程

Hold

Cycle: 1

25°C 10 min^{*4}

Stage 1: 预变性

Cycle: 1

95°C 30 sec

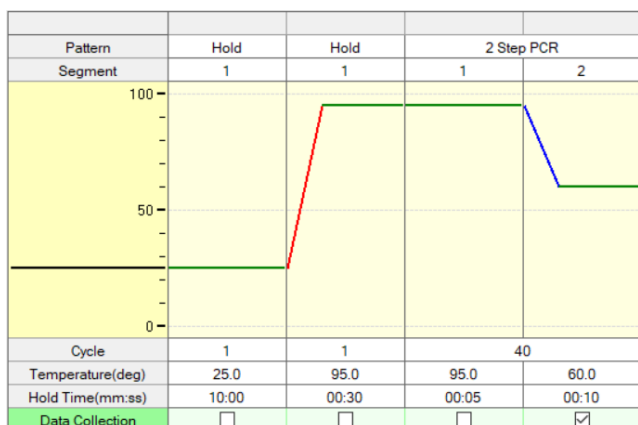
Stage 2: 2 step PCR反应

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 10 sec

实例：使用Thermal Cycler Dice Real Time System (Code No. TP1000/TP950/TP900/TP700) 操作流程



Shuttle PCR扩增标准程序

Hold: 预变性

Cycle: 1

25°C 10 min^{*4}

Hold: 预变性

Cycle: 1

95°C 30 sec

2 step PCR

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 10 sec

3. 反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线，进行PCR定量时制作标准曲线。

分析方法参见各仪器的使用说明书。

*1~*4: 请参考「PCR反应条件概述」

【使用Applied Biosystems QuantStudio5 Real-Time PCR System时的操作方法】

注意：请按照仪器的使用说明书进行操作。为减少仪器孔间产生的荧光信号误差，反应体系中需要添加ROX Reference Dye进行校正。

1. 按照下列组分配制PCR反应液（反应液配制请在冰上进行）。

<1个反应>

试剂	使用量 ^{*6}	终浓度
Fast Probe qPCR Mix, with UNG (2X)	12.5 μl	1X
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM ^{*1}
Probe ^{*2}	1 μl	
ROX Reference Dye II (50X)	0.25 μl	0.5X ^{*5}
Template ^{*3}	2 μl	
灭菌水	up to 25 μl	

2. 开始Real Time PCR反应。

PCR反应管请用离心机轻轻离心后放入Real Time PCR Detection System中进行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。

有关PCR的具体反应条件请参照「PCR反应条件概述」。

<QuantStudio5 Real-Time PCR System>

Shuttle PCR标准操作流程

Hold

Cycle: 1

25°C 10 min*4

Stage 1: 预变性

Cycle: 1

95°C 30 sec

Stage 2: 2 step PCR反应

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 10 sec

3. 反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线，进行PCR定量时制作标准曲线。

分析方法参见仪器的使用说明书。

*1~*4: 请参考「PCR反应条件概述」

<PCR反应条件概述>

阶段	温度	时间	检测	备注
预变性	95°C	30 sec	OFF	通常情况下，预变性95°C、30 sec即可，即使是环状质粒或基因组DNA等难以变性的模板，大部分在95°C、30 sec条件下都可以进行良好的PCR反应。也可以依据模板情况适当延长变性时间至95°C、1~2 min，但变性时间过长可能会导致酶失活，所以不建议超过2 min。

Shuttle PCR (二步法PCR)

循环数: 30-45 cycles

阶段	温度	时间	检测	备注
变性	95°C	3~5 sec	OFF	因一般Real Time PCR的目的片段长度低于300 bp，95°C、3~5 sec即可。
退火/延伸	56~64°C	10~30 sec	ON	优化反应条件时，在56~64°C范围内调整。如果反应效果不好，适当延长反应时间可以得到改善。

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

*2: 使用的探针浓度，根据使用的Real Time PCR扩增仪的型号和探针的荧光标记物不同而不同。

请参照仪器说明书或各荧光探针的具体使用要求进行。使用Thermal Cycler Dice Real Time System III (// 和Lite: 终卖)时，通常探针终浓度在0.1~0.5 μM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。在20 μl反应体系中，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%。

*4: 怀疑存在PCR产物污染时, 请进行25°C 10 min的反应步骤。通过UNG的作用, 降解先前反应产生的PCR产物。

*5: 使用ROX Reference Dye, 请参考下表:

种类	ROX Reference Dye (50X)	ROX Reference Dye II (50X)
适用仪器	StepOne、StepOnePlus	ABI7500 Fast、QuantStudio 3/5
使用浓度	最终浓度1X使用	最终浓度0.5X使用

不必使用ROX Reference Dye的仪器
Thermal Cycler Dice Real Time System系列、CronoSTAR 96、CFX96、LightCycler、Gentier 96E/96R

*6: 按照各Real Time PCR仪器的推荐量调整。

<各厂家qPCR仪器最短反应时间实验例>

Target: hACTB

扩增片段长度: 186 bp

厂家	型号	反应通道数	仪器最短 延伸时间	反应总时间	快速反应程序
Takara	TP950	1	9 sec	<30 min	2 step PCR: 40 cycles 95°C 1 sec 60°C xx* sec *: 按照各仪器最短延伸时间反应
Takara	TP1000	1	10 sec	<25 min	
Bio-Rad	CFX96	1	1 sec	<36 min	
Thermo Fisher Scientific	QuantStudio 5	2	5 sec	<22 min	
Takara	CronoSTAR 96	6	10 sec	<32 min	
Roche	LC480	1	1 sec	<30 min	
西安天隆	Gentier 96E	6	10 sec	<32 min	

<实验例: 高GC含量模板扩增>

Target Gene: ApoE (GC含量为64.52%)

模板量: 以相当于10 pg-100 ng的RNA量的cDNA作为模板。

PCR反应条件:

Hold

Cycle: 1

25°C 10 min^{*4}

Stage 1: 预变性

Cycle: 1

95°C 30 sec

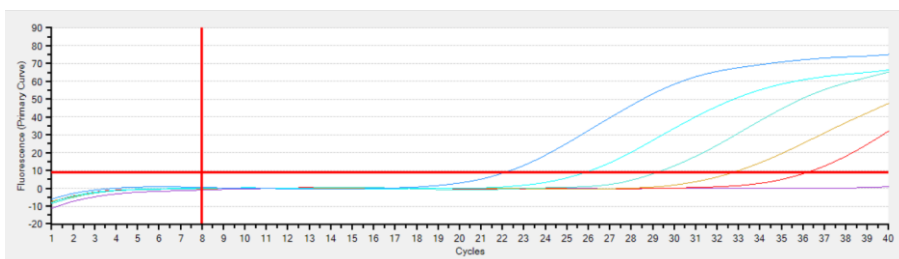
Stage 2: 2 step PCR反应

Cycle: 40

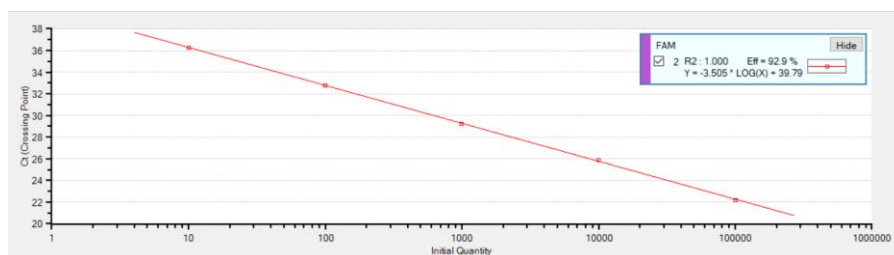
95°C 5 sec

60°C 10 sec

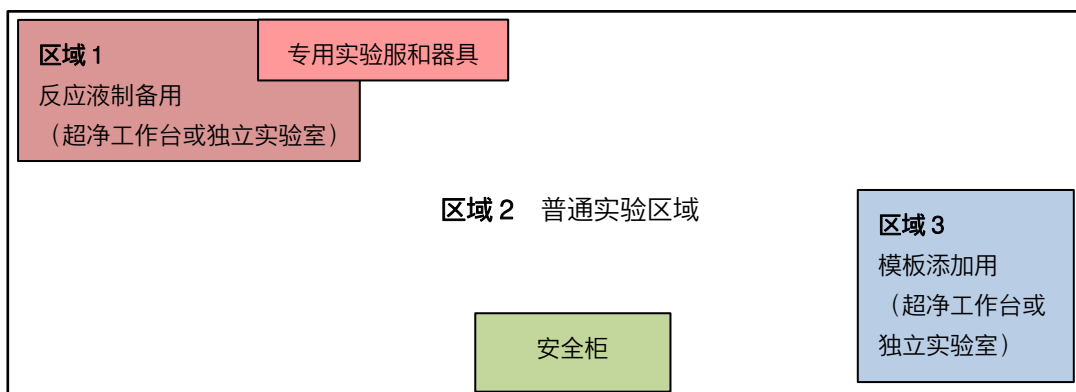
结果：
扩增曲线



标准曲线



●补充：关于区域划分



区域1：只进行反应试剂、Real Time PCR反应液的配制及分装（无模板操作区）

有条件时，建议设置独立实验室，实验服和器具专用。

区域2：普通实验区域，进行样品处理及DNA制备，根据需要设置安全柜。

区域3：高浓度DNA操作区域，在分装完成的反应液中添加模板DNA，标准品的稀释也在此区域进行。

有条件时，建议设置独立实验室，实验服和器具专用。

● 关联产品

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

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

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

PrimeScript™ FAST RT reagent Kit with gDNA Eraser (Code No. RR092A/RR092S)

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, 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）有限公司制作，最新版本文件请参考 Takara Bio（中国）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>