

Code No. RR420A

研究用

TaKaRa

TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™]
(Tli RNaseH 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
● 试剂盒外必备主要试剂和仪器	2
● 保 存	2
● 使用注意	3
● 操作方法	3
● 实验条件的选择	9
● 附 录	10
● 关联产品	12

● 制品说明

本制品是采用 TB Green 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。制品中含有 Real Time PCR 反应的最适浓度 TB Green，是一种 2X 浓度的 Premix Type 试剂，进行实验时，PCR 反应液的配制十分方便简单。制品中使用了抗 *Taq* 抗体的 Hot Start 法用 DNA 聚合酶 *TaKaRa Ex Taq*[®] HS，与 Real Time PCR 用适合 Buffer 组合，可以有效抑制非特异性的 PCR 扩增，大大提高 PCR 的扩增效率，可以进行高灵敏度的 Real Time PCR 扩增反应。

另外，本制品中添加了 Tli RNaseH(耐热性 RNaseH)，以 cDNA 作为模板进行 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。

本制品适合于快速 Real Time PCR 扩增反应，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量、检测，重复性好，可信度高。

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 *TaKaRa Ex Taq* HS，可以进行 Hot Start 法 PCR 反应，再与 Takara 特别开发的 Buffer 系统相结合，具有高扩增效率，高扩增灵敏度之特点。

4. 在 2X 浓度的 Premix 中，预先添加了耐热性 RNaseH(Tli RNaseH)，可以很好地抑制以 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。

● 试剂盒原理

本制品使用了 *TaKaRa Ex Taq* 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

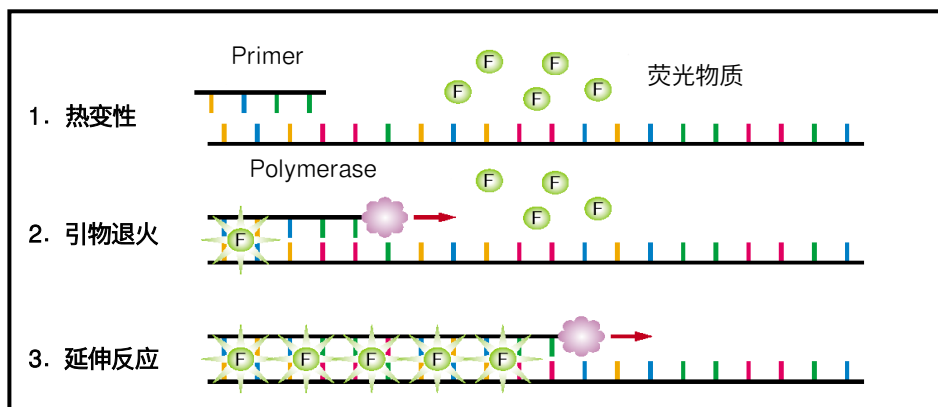
PCR 法是以微量 DNA 进行目的片段扩增的方法。通过 DNA 链的热变性、引物退火、DNA 聚合酶作用下引物的延伸三个步骤循环往复，可在短时间内扩增 DNA 达 100 万倍以上。

本制品中的 DNA 聚合酶由于使用了 *TaKaRa Ex Taq* HS，从而抑制在调制反应液等低温条件下由引物产生的非特异性退火或引物二聚体引起的非特异性扩增，大大提高 PCR 扩增灵敏度。

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 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 μ l 反应 $\times$ 200 次)

TB Green <i>Premix Ex Taq</i> (Tli RNaseH Plus) (*1)	1.0	ml $\times$ 5
ROX Reference Dye (50X Conc.) (*2)	200	μ l $\times$ 1
ROX Reference Dye II (50X Conc.) (*2)	200	μ l $\times$ 1

*1 内含 *TaKaRa Ex Taq* HS, dNTP Mixture, Mg²⁺, Tli RNaseH, TB Green。

*2 ROX Reference Dye 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。例如使用 Applied Biosystems 的 Real Time PCR 扩增仪进行实验就需要校正。

◆ 需要使用 ROX Reference Dye 校正的仪器

Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

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

◆ 需要使用 ROX Reference Dye II 校正的仪器

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

◆ 不需要校正的仪器

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

Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760: 终卖)

Smart Cycler II System (Cepheid)

LightCycler/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics)

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

● 试剂盒外必备主要试剂和仪器

1. 试剂

PCR 引物: 引物设计请参考“附录”。

灭菌水

2. 仪器

特定的反应板或微量离心管

微量移液器和枪头 (高压灭菌)

Real Time PCR 扩增仪 (authorized instruments)

适用的 Real Time PCR 扩增仪

Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

LightCycler/LightCycler480 System (Roche Diagnostics)

Smart Cycler II System (Cepheid)

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

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

Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760: 终卖)

注: 使用 Thermal Cycler Dice Real Time System II (Code No. TP900/TP960: 终卖) 时, 建议使用 TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus)(Code No. RR820A)。

● 保 存:

4℃可保存 6 个月。

避光保存, 避免污染。

长期保存请置于-20℃。产品融解后请于 4℃保存, 并在 6 个月内用完。

● 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. 使用前，请上下轻轻颠倒混匀，避免产生气泡，防止因混合不均匀造成的反应效果不佳。
 - (1) 请勿涡旋振荡混匀。
 - (2) TB Green Premix Ex Taq (2X conc.)在-20℃存放可能会产生白色或淡黄色的沉淀，可用手握缓慢溶解，于室温短时间避光放置，轻柔上下颠倒混匀直至沉淀全部消失。
 - (3) 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

*请按照不同仪器的操作手册提供的方法操作。

◆ 应用 Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR System 的操作方法

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
TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH 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) *2	0.4 μ l	1 μ l	1X
DNA 模板*3	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 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 ABI PRISM 7300 Real-Time PCR System 和 StepOnePlus 时，请使用 ROX Reference Dye (50X)。

*3 在 20 μ l 反应体系中，DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。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。

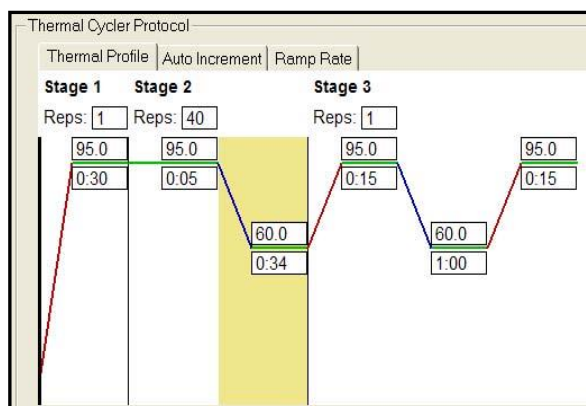
如果欲使用本制品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

*4 按照各仪器推荐体系进行反应液配制。

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 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「实验条件的选择」。

< Applied Biosystems 7300/7500 和 StepOnePlus Real-Time PCR System >



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 30~34 秒*

Dissociation stage

* 使用 StepOnePlus 时请设定在 30 秒。
使用 7300 时请设定在 31 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 3 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。

- 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/LightCycler480 System 的操作方法

- 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
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> (Tli RNaseH 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}
DNA 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 DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。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。

如果欲使用本制品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应, 第一步的 RT

反应液作为 DNA 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。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「实验条件的选择」

< 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 5 秒 20°C/秒

60°C 20 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>

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. 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 的操作方法

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
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> (Tli RNaseH Plus) (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}
DNA 模板 (<100 ng) ^{*2}	2.0 µl	
灭菌水	9.5 µl	
Total	25 µl	

*1 通常引物终浓度为 0.2 µM 可以得到较好结果。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 DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。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。

如果欲使用本制品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应, 第一步的 RT 反应液作为 DNA 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 反应管请用 Smart Cyclor 离心机轻轻离心后放入 Smart Cyclor 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。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「实验条件的选择」。

Stage 1			Stage 2				Stage 3			
Hold			Repeat 45 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	95.0	Ch1	0.2
			NA	95.0	5	Off				
			NA	60.0	20	On				
			☐ 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: 40 times

95°C 5 秒

60°C 20 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℃、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℃、30 秒。

3. 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。
使用 Smart Cycler System 进行分析时，请参考仪器的操作手册。

◆ 应用 CFX96 Real-Time PCR Detection System 的操作方法

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
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> (Tli RNaseH 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	

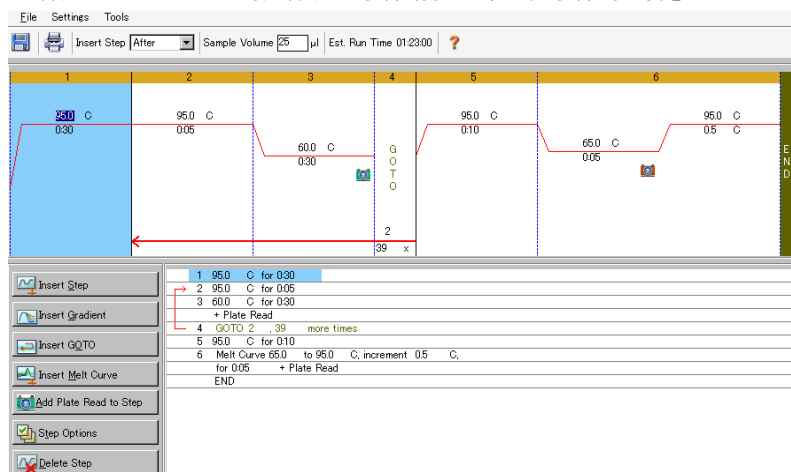
*1 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

*2 DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。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。

如果欲使用本制品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为 DNA 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。

建议采用下列两步法 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「实验条件的选择」。



两步法 PCR 扩增标准程序：

样品体积：25 μ l

Step 1: 95℃ 30 秒

Step 2: PCR 反应

GOTO: 39 (40 Cycles)

95℃ 5 秒

60℃ 30 秒

Step 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℃、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℃、30 秒。

- 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 Thermal Cycler Dice Real Time System III (*Lite*: 终卖) 的操作方法

- 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
TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH 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}	2.0 μ l	
灭菌水	9.5 μ l	
Total	25 μ l ^{*3}	

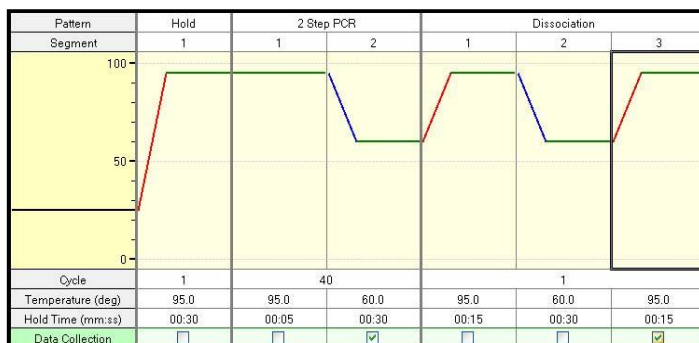
*1 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

*2 DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。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。另外，2 Step RT-PCR 反应的 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。

- 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 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「实验条件的选择」。



两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性

Repeat: 1

95℃ 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Repeat: 40

95℃ 5 秒

60℃ 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℃、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℃、30 秒。

- 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。

● 实验条件的选择

如果按照推荐的两步法条件进行反应，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。另外，根据反应情况选择特异性不同的 TB Green Premix series (Code No. RR820A/B, RR091A/B)，可提高 PCR 反应性能。

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，才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应具备以下条件：

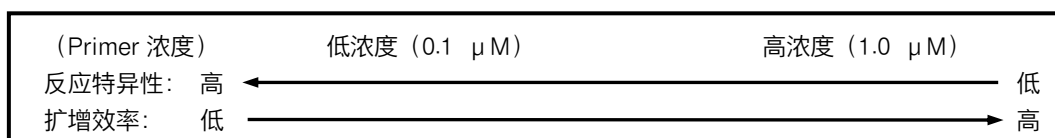
- No Template Control 时不产生引物二聚体等非特异性扩增。
- 不产生目的片段以外的扩增。

○ 扩增效率高的实验体系应具备以下条件：

- 扩增产物起峰更早 (Ct 值小)。
- PCR 扩增效率高 (接近理论值 100%)。

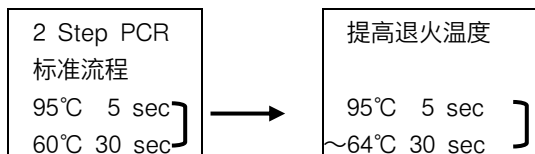
1. Primer 浓度与反应性能间的关系如下：

降低 Primer 浓度有助于提高特异性；提高 Primer 浓度有助于提高扩增效率。图示如下：

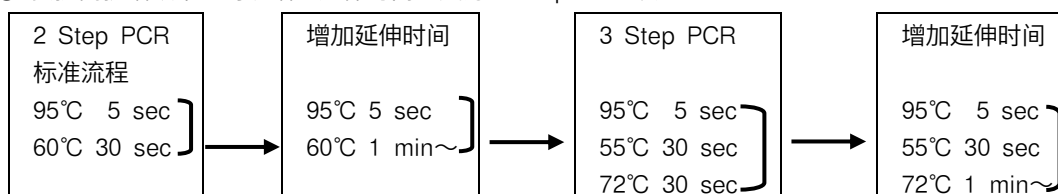


2. PCR 条件与反应性能间的关系如下：

① 要提高反应特异性，可以提高退火温度。



② 要提高扩增效率，可以增加延伸时间或变为 3 Step PCR 反应。

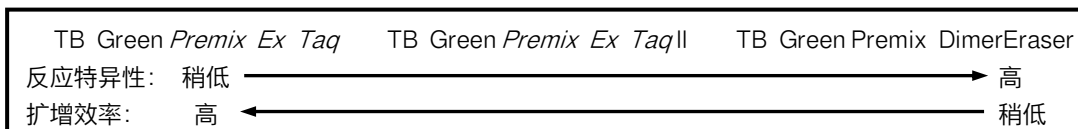


③ 预变性。

预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 模板基本上也能够很好的变性。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。

3. 各种试剂与反应性能间的关系如下：

Takara Bio 提供几种不同的 TB Green 嵌合法 real-time PCR 试剂，这些试剂的反应特异性以及扩增效率间有以下关系。TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A/B) 是扩增效率高的试剂，但是，如果想提高反应特异性，使用 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A/B) 或 TB Green Premix DimerEraser™ (Code No. RR091A/B) 则更有效。



● 附 录

1. 引物设计

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（可以延长至 300 bp）。

◆ 设计引物要求如下：

引物长度	17~25 mers
GC 含量	40~60%（45~55%理想）
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 *1: 63~68℃ Primer3 : 60~65℃
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' 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 BLAST *2 检索确认引物的特异性。

*1 OLIGO Primer Analysis Software(Molecular Biology Insights)

*2 <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和引物探针设计合成验证一条龙服务。

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

Real Time RT-PCR 的反转录反应建议使用 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A/B)、PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036A/B) 或 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code No. RR047A/B)。与本制品组合使用，可以获得可信性高的 PCR 反应结果。

- 按下列组份配制 PCR 反应液（反应液请在冰上配制）,配制量应稍大于实际需要用量，按 22.5~24 μl 等分溶液。

（使用 Thermal Cycler Dice Real Time System 时）

试剂	使用量	终浓度
TB Green Premix Ex Taq (2X)	12.5 μl	1X
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM
灭菌水	X μl	
Total	22.5~24 μl	

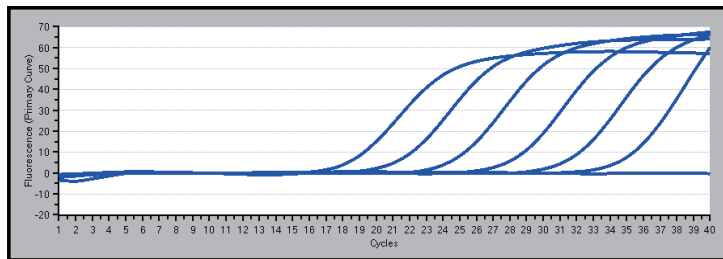
- 将上述 PCR 反应液加入 Real Time PCR 用反应管中，然后再加入 1~2.5 μl 的 RT 反应液（或 RT 反应的稀释液），保证最终反应体积为 25 μl 。

注：RT 反应液的加入量不要超过 2.5 μl 。

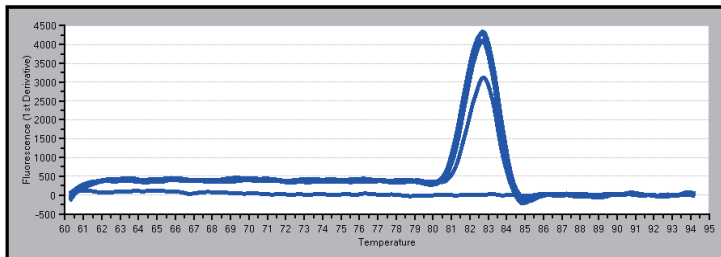
反应例

通过 Real Time RT-PCR 对 Human ATP5F1 mRNA 进行检出。cDNA 量相当于 Total RNA 1 pg~100 ng。使用灭菌水作为 Negative Control 用模板。Real Time PCR 的扩增曲线、融解曲线、标准曲线如下图。

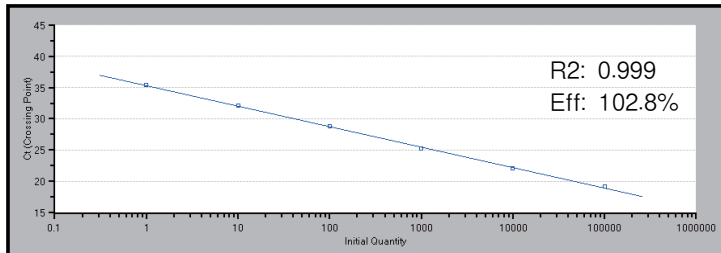
Real Time PCR 的扩增曲线。



Real Time PCR 的融解曲线。



Real Time PCR 的标准曲线。



● 关联产品

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

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

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

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

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