Code No. RR392A/S

研究用

TaKaRa

Probe qPCR Mix, with UNG

说明书

v202207Da

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
● 补充：关于区域划分	8
● 关联产品	8

● 制品说明

Probe qPCR Mix, with UNG 是采用探针法进行 Real Time PCR（qPCR）检测的专用试剂。通过分别对添加了抗体的 Hot Start PCR 酶和 Real Time PCR 用 Buffer 进行改良，实现了对 PCR 阻害物抵抗性高、扩增特异性高、检测灵敏度高等特点。此外，该产品也适用于快速 PCR，由于可在宽广的动态范围内实现准确的 target 定量，及重复性好的检出，因而可以用于可信度高的 Real Time PCR 分析。2×Premix 试剂中已添加了 Tli RNaseH（耐热性 RNaseH），在以 cDNA 为模板进行 PCR 反应时，可以很好地抑制 cDNA 中残存的 mRNA 对 PCR 反应的阻害作用。同时 Premix 中添加了 UNG（Uracil N-Glycosylase），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 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）
Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific Inc.）
CFX96 Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad Laboratories, Inc.）

● 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。

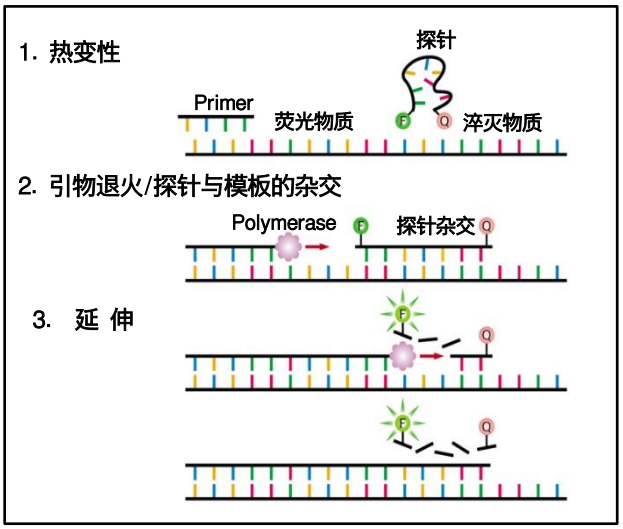
1. PCR

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（50 μl 反应×200 次）

	RR392A	RR392S
Probe qPCR Mix, with UNG（2×Conc.）*1	1 ml×5	1 ml
ROX Reference Dye（50×Conc.）*2	200 μl	40 μl
ROX Reference Dye II（50×Conc.）*2	200 μl	40 μl

*1 内含 PCR 酶，dNTP Mixture，Mg^{2+}，Tli RNase H 和 UNG。

*2 使用在 Applied Biosystems 等 Real Time PCR 扩增仪，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×）

7300 Real-Time PCR System

StepOnePlus Real-Time PCR System （以上 Thermo Fisher Scientific Inc.）

◆ 使用 ROX Reference Dye II（50×）的 PCR 仪（使用时终浓度为 0.5×）

7500 Real-Time PCR System

7500 Fast Real-Time PCR System （以上 Thermo Fisher Scientific Inc.）

◆ 不需要使用 ROX 的 PCR 仪

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

Thermal Cycler Dice Real Time System *II* /*Lite* (Code No. TP900/TP960/TP700/TP760：终卖)

CFX96 Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad Laboratories, Inc.）

● 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. 通过 Real Time PCR 反应，可以快速、准确地对目的基因进行检测、定量。
2. 2×浓度的 Premix 试剂，操作简便。
3. 对 PCR 阻害物抵抗性高，拓宽了前处理方法的简便化等使用用途。
4. 在 2×Premix 试剂中，预先添加了耐热性 Tli RNaseH（耐热性 RNaseH）和 UNG 酶。可以很好地抑制以 cDNA 作为模板进行 PCR 反应时，cDNA 中残存的 mRNA 对 PCR 反应造成的阻害作用；此外，通过使用 UNG 可以避免因交叉污染导致的假阳性。

● 操作注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项，<u>使用前请一定认真阅读</u>。

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

   Probe qPCR Mix, with UNG（2×Conc.）于−20℃保存时，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。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. 本制品中不含有探针和引物，请另行准备。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 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 扩增仪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 分钟的步骤。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 分钟的操作步骤。

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 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。

● 操作方法

【使用 Thermal Cycler Dice Real Time System III（*//* 和 *Lite*：终卖）时的操作方法】

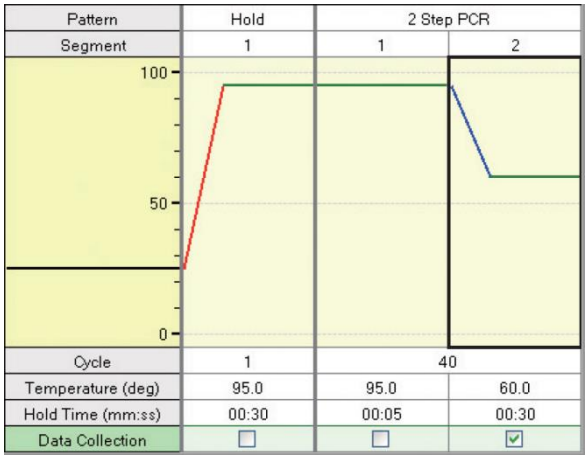
※ 请按照 Thermal Cycler Dice Real Time System 的使用说明书进行操作。

1. 按下列组份配制 PCR 反应液。

＜1 反应体系＞

试剂	使用量	终浓度
Probe qPCR Mix, with UNG（2×）	12.5 μl	1×
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	
模板[*3]	2 μl	
灭菌水	8.5 μl	
Total	25 μl	

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。退火/延伸时间可在 20～30 秒范围内进行设定，为了能够获得更稳定的实验结果首先尝试使用 30 秒的反应条件。
   有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件概述」。



Shuttle PCR 扩增标准程序

Hold（UNG）

Number of cycles: 1

25℃ 10 min*4

Hold：预变性

Number of cycles: 1

95℃ 30 sec

2 step PCR

Number of cycles: 40

95℃ 5 sec

60℃ 30 sec

3. 反应结束后确认扩增曲线，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」。

【使用 Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System、StepOnePlus 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。

1. 按下列组份配制 PCR 反应液。

＜1 反应体系＞

试剂	使用量	使用量	终浓度
Probe qPCR Mix, with UNG（2×）	10 μl	25 μl	1×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM*1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM*1
Probe*2	0.8 μl	2 μl	
ROX Reference Dye（50×）*5	0.4 μl	1 μl	1×
模板*3	2 μl	4 μl	
灭菌水	6 μl	16 μl	
Total	20 μl*7	50 μl*7	

2. 开始 Real Time PCR 反应。

建议采用下面 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」。

<7300 Real-Time PCR System>

Shuttle PCR 标准操作流程：

<Hold>

25℃ 10 min*4

Stage 1：预变性

Number of cycles: 1

95℃ 30 sec

Stage 2：PCR 反应

Number of cycles: 40

95℃ 5 sec

60℃ 31 sec*8

＜StepOnePlus Real-Time PCR System＞

Fast Protocol

<Hold>

25℃ 10 min[*4]

Holding stage

Number of cycles: 1

95℃ 20 sec

Cycling stage

Number of cycles: 40

95℃ 1 sec

60℃ 20 sec[*8]

3. 反应结束后确认扩增曲线，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。

＊1～8：请参考「PCR 反应条件概述」。

【使用 Applied Biosystems 7500/7500 Fast 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。

1. 按下列组份配制 PCR 反应液。

＜1 反应体系＞

试剂	使用量	使用量	终浓度
Probe qPCR Mix, with UNG（2×）	10 μl	25 μl	1×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM[*1]
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM[*1]
Probe[*2]	0.8 μl	2 μl	
ROX Reference Dye II（50×）	0.2 μl	0.5 μl	0.5×[*6]
模板[*3]	2 μl	4 μl	
灭菌水	6.2 μl	16.5 μl	
Total	20 μl[*7]	50 μl[*7]	

2. 开始 Real Time PCR 反应。
建议采用下面 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」。

<7500 Real-Time PCR System>

Shuttle PCR 标准操作流程

<Hold>

25℃ 10 min[*4]

Stage 1：预变性

Number of cycles: 1

95℃ 30 sec

Stage 2：PCR 反应

Number of cycles: 40

95℃ 5 sec

60℃ 34 sec[*8]

<7500 Fast Real-Time PCR System>

Fast Protocol

<Hold>

25℃ 10 min*4

Holding Stage

Number of cycles: 1

95℃ 20 sec

Cycling Stage

Number of Cycles: 40

95℃ 3 sec

60℃ 30 sec*8

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。

＊1～8：请参考「PCR 反应条件概述」。

【使用 CFX96 Real-Time PCR Detection System 时的操作方法】

注意：请按照 CFX96 Real-Time PCR Detection System 的使用说明书进行操作。

1. 按下列组份配制 PCR 反应液。

<1 反应体系>

试剂	使用量	终浓度
Probe qPCR Mix, with UNG（2×）	10 μl	1×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM*1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM*1
Probe*2	0.8 μl	
模板*3	2 μl	
灭菌水	6.4 μl	
Total	20 μl	

2. 开始 Real Time PCR 反应。
建议采用下面 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>

25℃ 10 min*4

Hold：预变性

Number of cycles: 1

95℃ 30 sec

2-step PCR

Number of cycles: 40

95℃ 5 sec

60℃ 30 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℃	30 sec	Off	通常情况下，预变性 95℃、30 秒即可。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℃、30 秒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℃、1～2 分钟，但变性时间过长可能会导致酶失活，所以不建议超过 2 分钟。

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℃	3～5 sec	Off	因一般 Real Time PCR 的目的片段长度低于 300 bp，95℃、3～5 秒钟即可。
退火/延伸	56～64℃	20～30 sec (31,34 sec）*8	On	优化反应条件时，在 56～64℃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 更易得到较好的结果，，反应性能较差时，可以在 0.1～1.0 μM 的范围内调整引物浓度。

2：使用的探针浓度，与使用的 Real Time PCR 仪器的型号和探针的荧光标记物质不同而不同。请参考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，通常终浓度在 0.1～0.5 μM 的范围内研讨。

*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℃ 10 分钟的反应步骤。通过 UNG 的作用，降解先前反应产生的 PCR 产物。

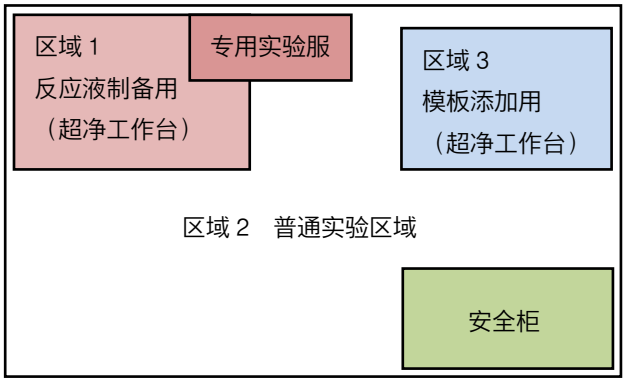
*5：ROX Reference Dye（50×）的反应终浓度为 1×。

*6：ROX Reference Dye II（50×）的反应终浓度为 0.5×。

*7：按照各 Real Time PCR 仪器的推荐量调整。

*8：仪器不同，检出步骤会有不能设置在 30 秒以内的情况。Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System 设置在 31 秒以上，Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 设置在 34 秒以上。

● 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）。
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。

● 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）
Probe qPCR Mix（Code No. RR391A/B）
One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix, with UNG (Code No. RR601S/A)
Thermal Cycler Dice™ Real Time System III（Code No. TP950/TP970/TP980/TP990）

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！

Thermal Cycler Dice 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

v202207Da