

Code No. RR390Q

研究用

TAKARA

Premix Ex Taq™
(Probe qPCR)

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 | 3 |
| ● 使用注意 | 3 |
| ● 操作方法 | 3 |
| ● 关联产品 | 12 |

● 制品说明

本制品是采用探针法进行 Real Time PCR (qPCR) 反应的专用试剂, 可用于快速 PCR。 *Premix Ex Taq* 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。 Mix 中添加了 Tli RNaseH (耐热性 RNaseH), 以 cDNA 作为模板进行 PCR 反应时, 可以很好地抑制由于 cDNA 中残存 mRNA 对 PCR 反应造成的阻害作用。 制品中使用了添加了抗体的 Hot Start PCR 酶 *TaKaRa Ex Taq* HS, 与 Takara 精心研制的 Real Time PCR 用 Buffer 组合使用, 可以有效抑制非特异性的 PCR 扩增, 大大提高 PCR 的扩增效率, 进行高灵敏度的 Real Time PCR 扩增反应。

本制品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. 是一种 Premix Type 试剂, 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。

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 // (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 and StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

LightCycler/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics)

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

Smart Cycler System/Smart Cycler II System (Cepheid)

● 试剂盒原理

本制品利用 *TaKaRa Ex Taq* HS 进行 PCR 扩增反应, 通过使用 Probe 对 PCR 扩增荧光信号强度进行检测。

1. PCR

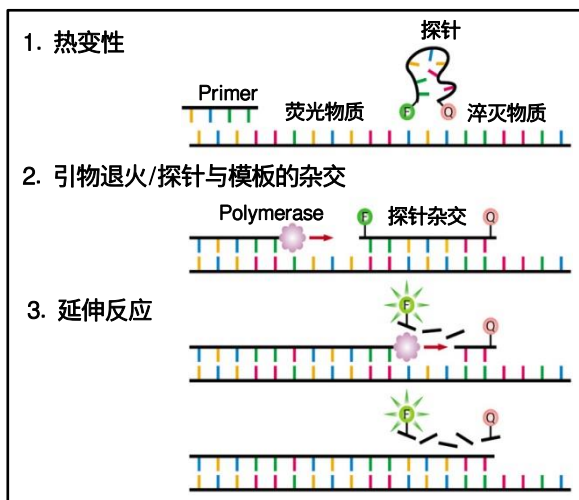
PCR 法是以微量 DNA 进行目的片段扩增的方法。通过 DNA 链的热变性、引物退火、DNA 聚合酶作用下引物的延伸三个步骤循环往复, 可在短时间内扩增 DNA 达 100 万倍以上。

本制品中的 DNA 聚合酶由于使用了 Hot Start PCR 酶 *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. 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, *Taq* 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 × 40 次)

| | |
|---|--------|
| <i>Premix Ex Taq</i> (Probe qPCR) (2X Conc.) *1 | 1.0 ml |
| ROX Reference Dye (50X Conc.) *2 | 40 μl |
| ROX Reference Dye II (50X Conc.) *2 | 40 μl |

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

*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 (使用时终浓度为 1X)

7300 Real-Time PCR System

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

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

7500 Real-Time PCR System

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

◆ 不需要使用 ROX 的 PCR 仪

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

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

LightCycler 480 System (Roche Diagnostics)

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

Smart Cycler System/Smart Cycler II System (Cepheid)

● 试剂盒外必备主要试剂和仪器

Real-Time PCR 扩增仪

实验专用的离心管或反应板

PCR 引物

检测用探针 (TaKaRa qPCR Probe, etc.)

灭菌水

微量移液器和枪头 (高压灭菌)

● 保存： 4℃保存（稳定性高达 6 个月）。

注意防止污染。

1. 使用前轻轻颠倒以确保试剂完全溶解并充分混匀。
2. 可在-20℃长期保存，一旦融解请于 4℃保存并在 6 个月之内使用完。

● 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，不能使用振荡器混匀。*Premix Ex Taq* (Probe qPCR) (2X Conc.) 于-20℃保存时容易形成沉淀，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. 融解后的试剂请于冰上放置。
3. 本制品中不含有探针。
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 III (*// and Lite* : 终卖) 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 |
|--|--------------|---------------|
| <i>Premix Ex Taq</i> (Probe qPCR) (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 | 1 μ l | *2 |
| 模板 | 2 μ l | *3 |
| 灭菌水 | 8.5 μ l | |
| Total | 25 μ l | |

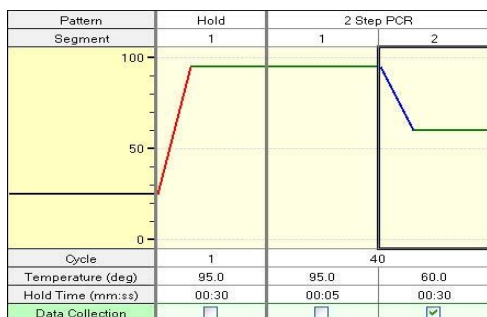
*1 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

*2 使用的探针浓度，与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，试剂使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行。使用 Thermal Cycler Dice Real Time System 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) 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。退火/延伸时间可在 20~30 秒范围内进行调整，推荐使用 30 秒的条件。有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件概述」。



两步法 PCR 扩增标准程序:

Stage 1: 预变性

Cycle: 1
95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Cycle: 40
95°C 5 秒
60°C 30 秒

◆ 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, 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 7300 Real-Time PCR System, StepOnePlus Real-Time PCR System 的操作方法

注意: 请按照各种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 |
|--|--------------|--------------|---------------|
| <i>Premix Ex Taq</i> (Probe qPCR) (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 |
| Probe | 0.8 μ l | 2 μ l | *2 |
| ROX Reference Dye (50X) *3 | 0.4 μ l | 1 μ l | 1X |
| DNA 模板 | 2 μ l | 4 μ l | *4 |
| 灭菌水 | 6 μ l | 16 μ l | |
| Total | 20 μ l*5 | 50 μ l*5 | |

*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 使用的探针浓度, 与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关, 实际使用时请参照仪器说明书, 或各荧光探针的具体使用要求进行。

*3 ROX Reference Dye 的反应终浓度为 1X。

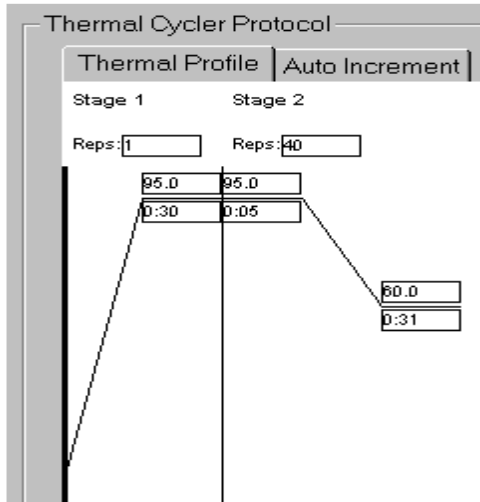
*4 在 20 μ l 反应体系中, DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同, 必要时可进行梯度稀释, 确定理想的 DNA 模板添加量。如果欲使用本制品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应, 第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

*5 根据各仪器推荐反应体系进行调整。

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。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 >



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 31 秒

< StepOnePlus Real-Time PCR System >



Shuttle PCR标准操作流程

Fast 模式:

Holding Stage

Number of Cycles: 1

95°C 20 秒

Cycling Stage

Number of Cycles: 40

95°C 1 秒

60°C 20 秒

◆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，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 的操作方法

注意：请按照各种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 |
|--|--------------|--------------|---------------|
| <i>Premix Ex Taq</i> (Probe qPCR) (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 |
| Probe | 0.8 μ l | 2 μ l | *2 |
| ROX Reference Dye II (50X) *3 | 0.2 μ l | 0.5 μ l | 0.5X |
| DNA 模板 | 2 μ l | 4 μ l | *4 |
| 灭菌水 | 6.2 μ l | 16.5 μ l | |
| Total | 20 μ l*5 | 50 μ l*5 | |

*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 使用的探针浓度，与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行。

*3 ROX Reference Dye II (50X) 最终使用浓度是 0.5X。

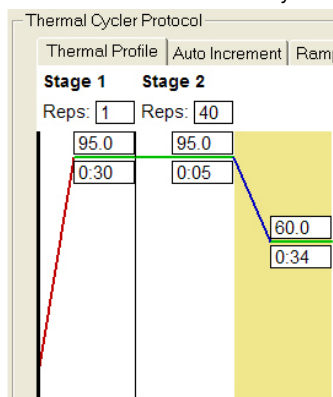
*4 在 20 μ l 反应体系中，DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定理想的 DNA 模板添加量。如果欲使用本制品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

*5 根据各仪器推荐反应体系进行调整。

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。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 >



两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性

Number of Cycles: 1

95°C 30 秒

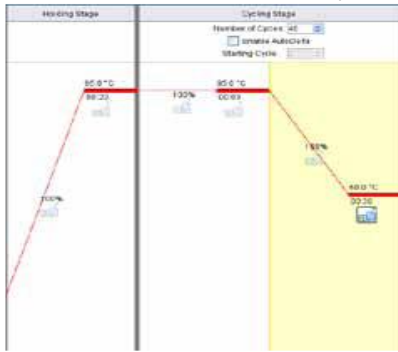
Stage 2: PCR 反应

Number of Cycles: 40

95°C 5 秒

60°C 34 秒

<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 20 秒

Stage 2: PCR 反应

Number of Cycles: 40

95°C 3 秒

60°C 30 秒

◆ 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, 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 System 的操作方法

请按照 LightCycler/LightCycler 480 (Roche Diagnostics 公司) 的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 |
|--|-------------|---------------------------|
| <i>Premix Ex Taq</i> (Probe qPCR) (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} |
| Probe | 0.8 μ l | *2 |
| DNA 模板 | 2 μ l | *3 |
| 灭菌水 | 6.4 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。

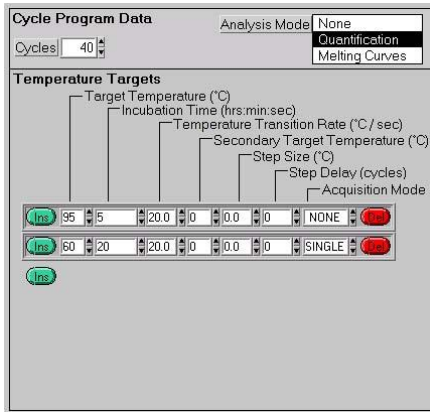
*2 使用的探针浓度, 与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关, 实际使用时请参照仪器说明书, 或各荧光探针的具体使用要求进行。

*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) 进行 Real Time PCR 反应。

PCR 反应用毛细管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 反应条件概述」。

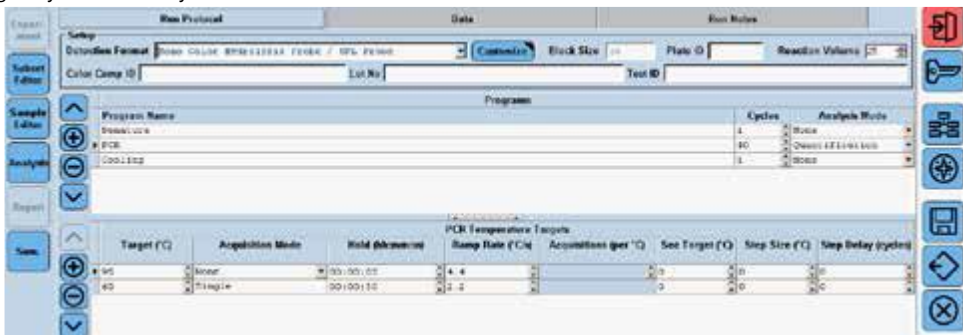
<LightCycler>



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

<LightCycler 480 System>



两步法 PCR 扩增标准程序:

- Denature
 95°C 30 秒 (Ramp rate: 4.4°C/sec)
 1 Cycle
- PCR
 Analysis Mode: Quantification
 95°C 5 秒 (Ramp rate: 4.4°C/sec)
 60°C 30 秒 (Ramp rate: 2.2°C/sec, Acquisition Mode : Single)
 40 cycles
- Cooling
 50°C 30 秒 (Ramp rate: 2.2°C/sec)
 1 cycle

◆ 特别提示:
 本产品中使用的 *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, 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 CFX96 Real-Time PCR Detection System 的操作方法

请按照 CFX96 Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD) 的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 |
|--|--------------|---------------------------|
| <i>Premix Ex Taq</i> (Probe qPCR) (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 | 1 μ l | ^{*2} |
| DNA 模板 | 2 μ l | ^{*3} |
| 灭菌水 | 8.5 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。

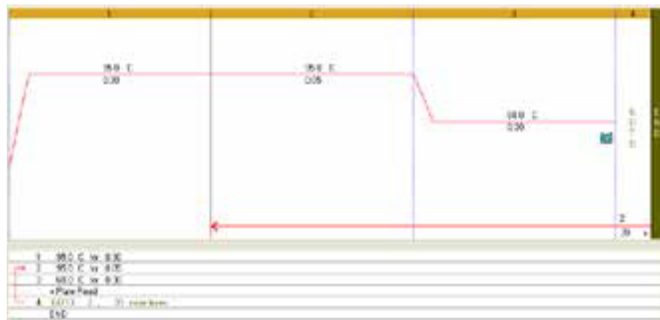
*2 使用的探针浓度,与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关,实际使用时请参照仪器说明书,或各荧光探针的具体使用要求进行。

*3 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,确定理想的 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 反应条件概述」。



两步法 PCR 扩增标准程序:

反应体系: 25 μ l

Step 1: 95°C 30 秒

Step 2: PCR

GOTO: 39 (40 cycles)

95°C 5 秒

60°C 30 秒

◆ 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,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 |
|--|--------------|---------------------------|
| <i>Premix Ex Taq</i> (Probe qPCR) (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 | 1 μ l | *2 |
| DNA 模板 | 2 μ l | *3 |
| 灭菌水 | 8.5 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 使用的探针浓度，与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行。使用 Smart Cyclor System/Smart Cyclor II System 时，通常在 0.1~0.5 μ M 范围内调整终浓度。

*3 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，确定理想的 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 反应管用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。有关 PCR 的具体反应条件请参照「PCR 反应条件概述」。

| Stage 1 | | | Stage 2 | | |
|---------|------|--------|--|------|------|
| Hold | | | Repeat 40 times. | | |
| Temp | Secs | Optics | 2-Temperature Cycle | | |
| 95.0 | 30 | Off | Deg/Sec | Temp | Secs |
| | | | NA | 95.0 | 5 |
| | | | NA | 60.0 | 20 |
| | | | | | |
| | | | <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: 40

95°C 5 秒

60°C 20 秒

◆ 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，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 反应条件概述

预变性

| 阶段 | 温度 | 时间 | 检测 | 备注 |
|-----|------|-------|----|--|
| 预变性 | 95°C | 30 秒钟 | 关 | 通常情况下，即使模板是环状质粒或基因组 DNA，预变性时使用 95°C 30 秒钟即可，也可以依据模板情况适当延长变性时间到 1-2 分钟。因变性时间过长可能会降低酶活性，所以不能超过 2 分钟。 |

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 秒钟 | 关 | 如果 Real Time PCR 目的片段长度低于 300 bp，则 95°C 变性 3-5 秒钟即可。 |
| 退火/延伸 | 56-64°C | 20-30 秒钟 (31, 34 秒钟) * | 开 | 请先尝试常规程序。如需优化温度，建议在 56-64°C 范围内调整。如果反应效果不好，可以适当延长反应时间。 |

* 某些仪器的检测时间必须设置在 30 秒钟以上。

使用 Applied Biosystems 7300 时请设定为 31 秒或更长；使用 Applied Biosystems 7500 时请设定为 34 秒或更长。

◆ 进行 Real-Time RT-PCR 的操作程序

要合成 cDNA 模板进行 Real-Time RT-PCR 反应，推荐结合使用 PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037A)。按如下操作进行反转录反应。

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 |
|---|--------------------------|----------|
| 5X PrimeScript Buffer (for Real Time) | 2 μ l | 1X |
| Random 6 mers (100 μ M) * ¹ | 2 μ l | 200 pmol |
| Oligo dT Primer (50 μ M) * ¹ | 0.5 μ l | 25 pmol |
| PrimeScript RT Enzyme Mix I | 0.5 μ l | |
| Total RNA | | |
| RNase Free dH ₂ O | | |
| Total | 10 μ 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 μ M) 2 μ l (200 pmol)

Oligo dT Primer (50 μ M) 0.5 μ l (25 pmol)

Specific Primer (2 μ M) 0.5 μ l (1 pmol)

*2 反应体积可按需求相应放大，10 μ l 的反应体系可最大使用 1 μ g 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，建议反转录反应条件设置为 42°C 15 min。PCR 反应有非特异扩增时，将温度升至 50°C 会有所改善。

3. PCR 反应

请按照“操作方法”进行 PCR 反应。

● 关联产品

Probe qPCR Mix(Code No. RR391A/B)

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)

One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR064A)

TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A/B)

TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A/B)

TB Green® Fast qPCR Mix (Code No. RR430A/B)

One Step TB Green® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR096A/B)

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!

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

Premix Ex Taq , 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>