

Code No. RR82LR

研究用

TAKARA

TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] II
(Tli RNaseH Plus), ROX 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	1
● 保 存	2
● 试剂盒外必备主要试剂和仪器	2
● 使用注意	2
● 操作方法	2
● 附 录	4
● 关联产品	7

● 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 和 ROX Reference Dye，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。

本制品中还添加了 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 Buffer 经过改良，反应特异性更高，能抑制非特异性反应，可以在宽广的范围内进行更加准确的定量。本 Buffer 和 Hot Start 法用 DNA 聚合酶 *TaKaRa Ex Taq*[®] HS 组合使用，可以进行重复性好、可信度高的 Real Time PCR 解析。

适用的 Real Time PCR 扩增仪

◆ 需要使用 ROX Reference Dye 进行信号校正的仪器*

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

◆ 不需要使用 ROX Reference Dye 进行信号校正的仪器

- 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)

(注) 使用 Smart Cycler System/Smart Cycler II System (Cepheid)时，建议使用 TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A/B/L/W、RR42LR/WR)

*: 对于 Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)，需要使用 ROX Reference Dye II 校正，推荐使用 TB Green *Premix Ex Taq* II(Tli RNaseH Plus)，Bulk (Code No. RR820L/W)。

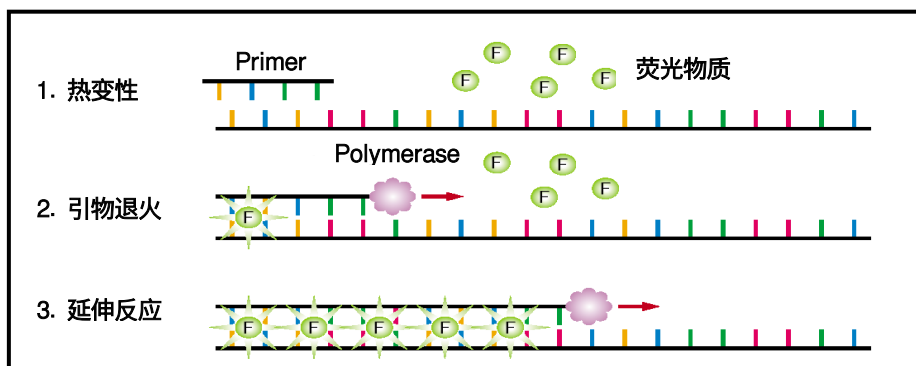
● 试剂盒原理

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。

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。

嵌合荧光检测法

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 μl 反应×200 次)

TB Green *Premix Ex Taq* II (2X) (Tli RNaseH Plus)，ROX plus* 5 ml

* 内含 *TaKaRa Ex Taq* HS, dNTP Mixture, Mg²⁺, Tli RNaseH, TB Green 和 ROX Reference Dye。

● 保存:

4°C可保存6个月。

避光保存, 避免污染。

长期保存请置于-20°C。产品融解后请于4°C保存, 并在6个月内用完。

● 试剂盒外必备主要试剂和仪器

Real time PCR 扩增仪 (authorized instruments)

qPCR 实验专用的离心管或反应板

PCR 引物: 引物设计请参考“附录”。

灭菌水

微量移液器和枪头 (高压灭菌)

● 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。

- 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。
 - 请勿使用振荡器振荡混匀。
 - TB Green *Premix Ex Taq* II (2X) (Tli RNaseH Plus), ROX plus 在-20°C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(<30°C)短时间避光放置, 轻柔上下颠倒混匀直至沉淀全部消失。
 - 沉淀会导致溶液成分不均匀, 使用前务必充分混匀试剂。
- 配制反应液时, 试剂请于冰上放置。
- 本制品中含有 ROX Reference Dye 和 TB Green, 配制 PCR 反应液时应避免强光照射。
- 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。
- 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。

● 操作方法

◆ 应用 StepOnePlus Real-Time PCR System 的操作方法

*请按照各种仪器使用说明书要求进行实验操作。

- 按下列组分配制 PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。考虑到吸取误差, 配置的预混液体积要至少多于所有反应应用总体积的 10%。

试剂	使用量	终浓度
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (2X) (Tli RNaseH Plus), ROX plus	10 μ l	1X
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.8 μ l	0.4 μ M ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.8 μ l	0.4 μ M ^{*1}
DNA 模板 (<100 ng) ^{*2}	2 μ l	
灭菌水	6.4 μ l	
Total	20 μ l	

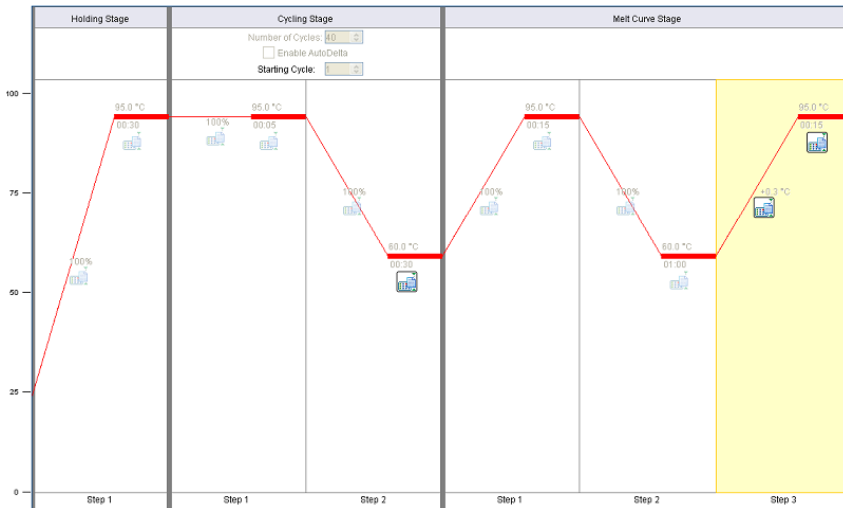
*1 通常引物终浓度为 0.4 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在 0.2~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

*2 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%。

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 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：
 Holding Stage
 Step1: 95°C 30 sec
 Cycling Stage
 Cycles: 40
 Step1: 95°C 5 sec
 Step2: 60°C 30 sec
 Melt Curve Stage

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 Thermal Cycler Dice Real Time System 系列的操作方法

1. 按下列组分配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。考虑到吸取误差，配置的预混液体积要至少多于所有反应用总体积的 10%。

试剂	使用量	终浓度
TB Green Premix Ex Taq (2X) (Tli RNaseH Plus), ROX plus	12.5 μl	1X
PCR Forward Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM*1
PCR Reverse Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM*1
DNA 模板 (<100 ng) *2	2 μl	
灭菌水	8.5 μl	
Total	25 μl*3	

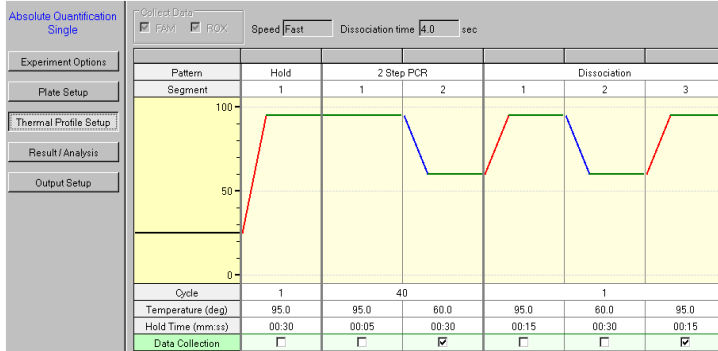
*1 通常引物终浓度为 0.4 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.2~1.0 μM 范围内调整引物浓度。

*2 25 μl 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。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。

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。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」。



两步法 PCR 扩增标准程序：

- Hold (预变性)
Cycle: 1
95°C 30 sec
- 2 Step PCR
Cycles: 40
95°C 5 sec
60°C 30 sec
- Dissociation

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。

● 附录

(1) 实验条件的选择

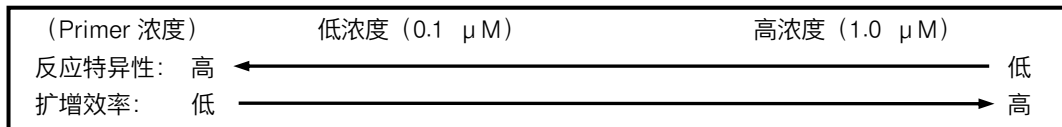
如果按照推荐的两步法条件进行反应，反应性能不好时，请按照下面的方法进行引物和 PCR 反应条件的研讨。另外，根据反应情况选择特异性不同的 TB Green Premix series (Code No. RR420A/B/L/W、RR42LR/WR、RR091A/B)，可提高 PCR 反应性能。

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%)。

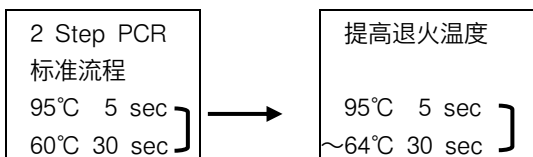
[Primer 浓度与反应性能间的关系]

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：

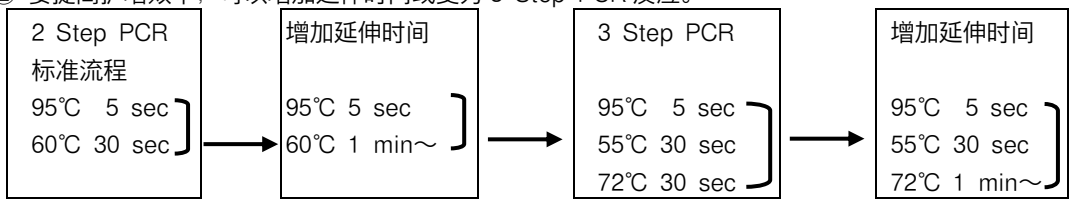


[PCR 条件与反应性能间的关系]

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。

[各种试剂与反应性能间的关系]

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* II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A/B/L/W、RR82LR/WR) 是兼顾了扩增效率和反应特异性的试剂，为了提高特异性，可使用 TB Green *Premix DimerEraser*TM (Perfect Real Time) (Code No. RR091A/B)。但是，对于难扩增的产物，使用 TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A/B/L/W、RR42LR/WR) 则更有效。

(试剂) TB Green <i>Premix Ex Taq</i> (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A/L、RR42LR)	TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820A/L、RR82LR)	TB Green <i>Premix DimerEraser</i> (Perfect Real Time) (Code No. RR091A/B)
反应特异性: 稍低	—————→ 高	
扩增效率: 高	←———— 稍低	

(2) 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。使用以下原则设计合成的 RT-PCR 引物适用于两步 PCR 的标准操作方法。

◆ PCR 扩增产物长度： 80~150 bp 最为合适（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%最佳)
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°C Primer3 : 60~65°C
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' 末端碱基最好为 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, 恕不接受不在本公司合成的引物/探针的设计委托!

(3) 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。RT 反应条件请参考产品说明书。

以下是使用 PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036A/B) 进行反转录反应的实验例。

- 按下列组分配制反转录反应液 (反应液请在冰上配制)

试剂	使用量	终浓度
5X PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)	2 μ l	1X
Total RNA *	x μ l	
RNase Free dH ₂ O	Up to 10 μ l	

* 根据需要按比例放大反转录反应体系。在 10 μ l 反转录反应体系中可加入约 500 ng total RNA。

- 进行反转录反应。

37°C 15 min (反转录反应)

85°C 5 sec (反转录酶热失活)

4°C

- 根据操作流程进行 PCR 反应。

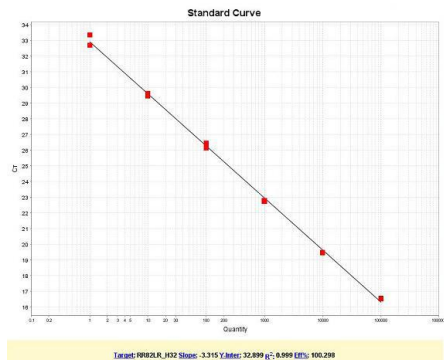
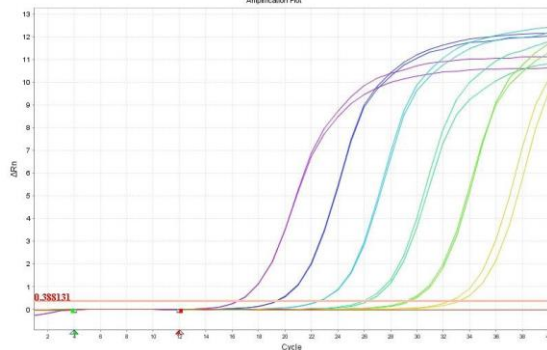
反应例 (StepOnePlus Real-Time PCR System)

反转录反应

Template: HL60 total RNA (1 pg~100 ng)

Real-time PCR

Target: Human *TFRC*



● 关联产品

TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B)
TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] II (Tli RNaseH Plus), Bulk (Code No. RR820L/W)
TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420Q/A/B)
TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] (Tli RNaseH Plus), Bulk (Code No. RR420L/W)
TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] (Tli RNaseH Plus), ROX plus (Code No. RR42LR/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, Thermal Cycler Dice, DimerEraser, 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>

v202203Da