



# Takara 分子诊断原料手册



that's  
**GOOD**  
science!™



Clontech Takara cellartis

20多年来，Takara（中国）与中国的企业客户、政府部门客户等机构客户的合作关系在规模上逐步扩大，在领域上由窄至宽，在程度上由浅到深。先进的产品研发技术、令人放心的质量保证、想客户所想的服务原则，使得Takara在中国的机构客户中赢得了众多的合作伙伴。Takara为此深感荣幸。

我们将竭尽全力满足您的要求，不管您是寻找OEM伙伴，还是订制组份、批量采购，我们都将坚守一个承诺：帮助您实现您的目标。

如今，Takara为中国几千家生物技术、分子诊断、生物医药、生物健康等企业提供全面的解决方案，主要涉及三个大的方面，即

1. 项目整体解决方案：提供包括项目研发、项目产品化“一站式”解决方案

2. 贴牌生产（OEM）

3. 按订单生产

### ■ 项目整体解决方案

Takara伴随中国生物技术产业发展20多年，见证了中国生命产业从科研一花独放至技术应用后来居上的巨大变化。在此变革中，Takara凭借深厚的技术底蕴和严谨的质量系统，为各个领域的机构客户提供从技术论证到研发立项、从实验室研发到产品定型、从生产方案到品质控制方案等一系列的解决方案。Takara在如下领域积累了丰富的工业客户服务经验：

- 分子诊断产品
- 动物疾病分子诊断
- 诊断用高级抗体

### ■ 贴牌生产(OEM)和按订单生产

Takara为世界上许多知名的生物技术、生物医药、健康产品提供合同生产服务。我们在高端酶、分子诊断试剂盒成分、细胞生物学产品、生物化学品等领域提供合同生产解决方案。

#### • 可合同生产的品目

目前Takara提供多达上百种产品可进行合同生产。这些产品的品质均达到与Takara, Clontech, Cellartis brands产品的同等标准。

#### • 可合同生产品目主要的应用领域

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| ① Applied Markets – Diagnostics     | ② Applied Markets – Veterinary Diagnostics |
| ③ Applied Markets – AgBio           | ④ Enzymes for Industry Applications        |
| ⑤ Next Generation Sequencing (NGS)  | ⑥ Genetic Analysis                         |
| ⑦ Viral Transfection & Transduction | ⑧ Translational Research                   |

• Takara的高水准合同生产能力

 <b>初步咨询</b>	 <b>订制配方</b>	 <b>制造 &amp; 包装</b>	 <b>持续的支持</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 确定您的订制需求</li> <li>• 提供报价/预计交货期</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 提供小规模制造</li> <li>• 提供初步测试样品</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 设计订制包装/标签</li> <li>• 生产订制品/试剂盒</li> <li>• 按照您的要求进行QC检测</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 提供可靠的产品供应</li> <li>• 确定交货时间表</li> <li>• 提供持续的技术支持</li> </ul>

• 按订单生产

Takara为机构客户提供灵活的客户订制生产。对于我们销售的大多数产品，Takara都提供如下服务：

- ① 订制配方    ② 订制包装    ③ Glycerol-free    ④ 高浓度制品

■ PCR酶/RT酶产品

● Standard use		● High yield		● Long PCR	
Application	General applications, multiplexing	Application	Mammalian genotyping	Application	Long PCR, sequencing, cloning
Recommended product	TaKaRa Taq DNA Polymerase	Recommended product	Titanium Taq DNA Polymerase	Recommended product	Takara LA Taq DNA Polymerase
Choose for	Routine use	Choose for	Sensitivity and robustness	Choose for	Maximum length
Amplicon size		Amplicon size		Amplicon size	
gDNA	<3 kb	gDNA	<2 kb	gDNA	<30 kb
Plasmid/lambda	<12 kb	Plasmid/lambda	<2 kb	Plasmid/lambda	<48 kb
cDNA	NA	cDNA	<4 kb	Enzyme properties	
Enzyme properties		Enzyme properties		5'→3' exonuclease activity	✓
5'→3' exonuclease activity	✓	5'→3' exonuclease activity		3'→5' exonuclease activity	✓
3'→5' exonuclease activity		3'→5' exonuclease activity		T/A overhangs or blunt	T/A
T/A overhangs or blunt	T/A	T/A overhangs or blunt	T/A	Fidelity (Kunkel)	
Format/features		Format/features		Fidelity (Sequencing)	
Premix	Available	Premix		Speed	60 sec/kb
Dye added		Eco-friendly format	Available	GC-rich targets	Up to 67%
Hot start	Available	PCR kit with control template and primers available	✓	Format/features	
		Dye added		Premix	Available
		Hot start	✓	Hot start	Available

# TaKaRa Taq™ Hot Start Version

## TaKaRa Taq™

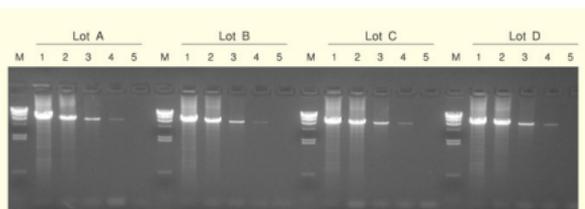
### 基础酶

#### 【扩增片段的标准】

λ DNA: ~12 kb  
Human genome DNA: ~3 kb

TaKaRa Taq™ 是基础酶，一般 1 kb 以下片段的扩增与 TaKaRa Ex Taq®、TaKaRa LA Taq® 一样能得到很好的扩增。批次间也没有反应性能差异，可以放心使用。Hot Start Version 是添加抗 Taq 抗体的 Hot Start PCR 酶，可以实现高特异性的 PCR 扩增。

### 多批次间反应性能的比较



模板: λ DNA  
扩增链长: 8 kb  
模板量 (50 μl 反应体系):  
Lane 1: 1 ng  
2: 100 pg  
3: 10 pg  
4: 1 pg  
5: Negative Control  
M: λ-Hind III digest

PCR 条件:  
94°C 30 sec ] 30 Cycles  
65°C 10 min ]

具有良好扩增效率和高通用性的畅销PCR酶

# TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version

## TaKaRa Ex Taq®

### 灵敏度

TaKaRa Ex Taq® 是一种具有高灵敏度、高扩增量及高通用性的PCR酶。尤其在模板量非常少的情况下或含有杂质的反应体系中能够发挥强大威力。有时使用 Taq DNA Polymerase 不能扩增的DNA片段，使用 TaKaRa Ex Taq® 则可以扩增。Hot Start Version 是添加抗 Taq 抗体的 hot Start PCR 酶，无需改变循环条件，便可进行高灵敏度、高特异性的PCR扩增。

### 扩增量

### 通用性

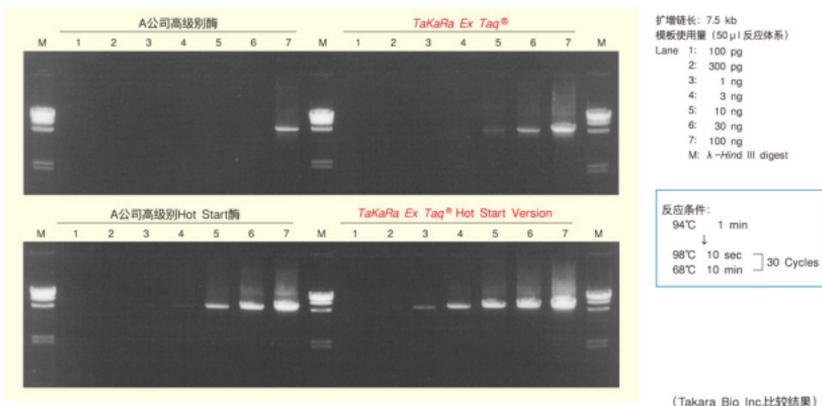
#### 【扩增片段的标准】

λ DNA: ~30 kb  
Human genome DNA: ~20 kb

## ■ 与其他公司高级别PCR酶的扩增效率比较

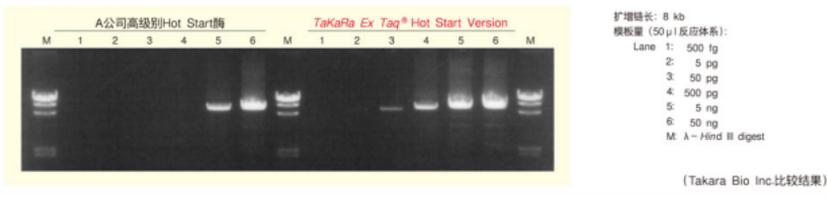
### 1) 以人基因组DNA为模板, 改变模板量进行PCR扩增

以人基因组DNA为模板, 与其他公司高级别PCR酶的扩增性能进行了比较。结果显示, *TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup>*和*TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version*显示高出1个数量级的灵敏度。



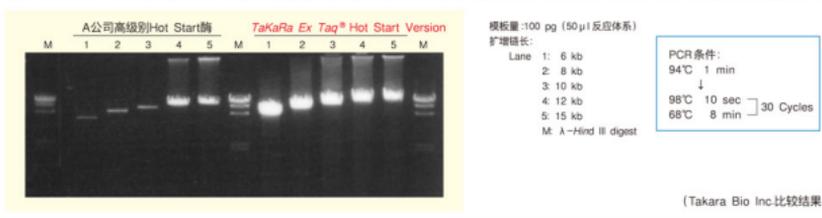
### 2) 以大肠杆菌基因组DNA为模板, 改变模板量进行PCR扩增

以大肠杆菌基因组DNA为模板, 与其他公司高级别PCR酶的扩增性能进行了比较。结果显示, *TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version*显示高出2个数量级的灵敏度。



### 3) 以 $\lambda$ DNA 为模板, 扩增不同大小的片段

以  $\lambda$  DNA 为模板, 与其他公司高级别PCR酶的扩增性能进行了比较。结果显示, *TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> Hot start Version*可获得高灵敏度、高收量的扩增。



## 长链DNA扩增及具有复杂结构的DNA扩增

# TaKaRa LA Taq® Hot Start Version TaKaRa LA Taq® TaKaRa LA Taq® with GC Buffer

长链扩增

扩增量

GC rich 序列※

TaKaRa LA Taq® 是适用于扩增长链DNA的PCR酶，尤其在扩增15 kb以上的DNA片段时特别有效。当扩增富含GC序列等复杂二级结构的模板时，用 TaKaRa LA Taq® with GC Buffer进行PCR扩增非常有效。Hot Start Version是添加抗Taq抗体的Hot Start PCR酶，在不改变循环条件的情况下，可进行高灵敏度、高特异性的PCR扩增。

※仅限 TaKaRa LA Taq® with GC Buffer

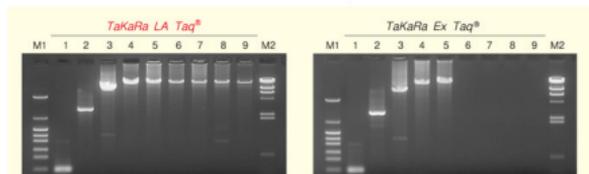
【扩增片段的标准】

λ DNA: ~40 kb  
Human genome DNA: ~30 kb

### ■ 对于不同长度的目的基因，TaKaRa LA Taq®、TaKaRa Ex Taq® 的扩增效率比较

#### 1) 以人基因组DNA为模板进行扩增

TaKaRa LA Taq® 可扩增 30 kb 的片段、TaKaRa Ex Taq® 可扩增 23 kb 的片段。

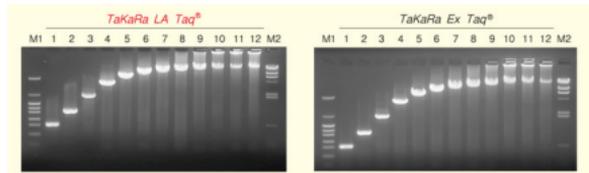


扩增链长:

Lane 1: 0.262 kb  
Lane 2: 2.9 kb  
Lane 3: 8.5 kb  
Lane 4: 17.5 kb  
Lane 5: 23.2 kb  
Lane 6: 27 kb  
Lane 7: 28.4 kb  
Lane 8: 29.9 kb  
Lane 9: 30.8 kb  
M1: pHY Marker  
M2: λ-Hind III digest

#### 2) 以λ DNA为模板进行扩增

TaKaRa LA Taq® 可很好地扩增 35 kb 的片段。

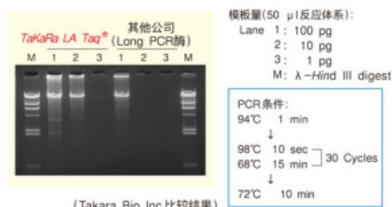


扩增链长:

Lane 1: 0.5 kb  
Lane 2: 1 kb  
Lane 3: 2 kb  
Lane 4: 4 kb  
Lane 5: 6 kb  
Lane 6: 8 kb  
Lane 7: 10 kb  
Lane 8: 12 kb  
Lane 9: 15 kb  
Lane 10: 20 kb  
Lane 11: 28 kb  
Lane 12: 35 kb  
M1: pHY Marker  
M2: λ-Hind III digest

### ■ TaKaRa LA Taq® 与其他公司 Long PCR 酶的扩增效率比较

#### 1) 以λ DNA为模板扩增28 kb片段

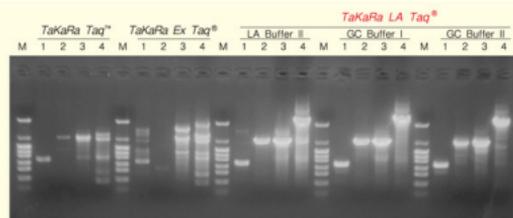


#### 2) 以人基因组DNA为模板扩增28.4 kb片段



## Taq酶系列产品扩增 GC rich 目的基因的比较

使用Taq系列的各 PCR 酶扩增 GC rich 目的基因并进行比较, 结果显示, TaKaRa LA Taq® 配合 GC Buffer 使用时可以得到高特异性的扩增。  
(注意: GC Buffer II 不适用于>10 kb 的长链扩增。)



模板: 人基因组 DNA (100 ng/50 μl 反应体系)

Target:

Lane 1: APOE 746 bp (GC 74%)  
Lane 2: TGFβ1 2,005 bp (GC 69%)  
M: pHY Marker

模板: *T.thermophilus* HB8 基因组 DNA  
(10 ng/50 μl 反应体系)

扩增链长:

Lane 3: 2,029 bp (GC 74%)  
Lane 4: 4,988 bp (GC 74%)

进行三步法PCR反应:  
98°C 10 sec  
60°C 30 sec  
72°C 1 min/kb } 30 Cycles

## TaKaRa Taq™ HS Low DNA

Low DNA 型

检测灵敏度高

TaKaRa Taq™ HS Low DNA 利用Takara特别开发的精制技术和DNA失活技术, 可非常好地抑制试剂中含有的宿主大肠杆菌来源DNA及从环境中混入的DNA, 是一种预混型PCR酶。

使用了具有高延伸速度和高特异性的改良型 Taq DNA polymerase, 可快速地进行高灵敏度的特异性 PCR 扩增。

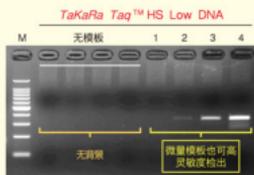
适用于微生物的高灵敏度检出、16S 菌群分析, 以及进行 No Template Control 扩增时, 出现背景对解析产生很大影响的反应体系。

【扩增片段的标准】

λ DNA: ~12 kb

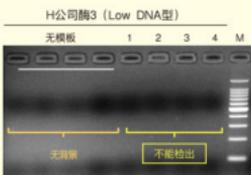
Human genome DNA: ~3 kb

### 快速、高灵敏度检出



PCR 反应所需时间  
(35 Cycles) 58 分钟

Lane 1: 大肠杆菌基因组 DNA 1 cell 相当  
Lane 2: 10 cells 相当  
Lane 3: 10<sup>2</sup> cells 相当  
Lane 4: 10<sup>3</sup> cells 相当  
M: 100 bp DNA Ladder

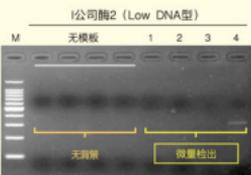


PCR 反应所需时间  
(35 Cycles) 1小时49分钟

目的基因: 大肠杆菌16S rDNA 348 bp  
PCR反应: 使用Thermal Cycler Dice Gradient (Code No. TP600)

TaKaRa Taq™ HS Low DNA 在进行无模板的PCR反应时, 可完全抑制背景, 同其他公司相比, 可在短时间内高灵敏度地检测出微量模板。

(Takara Bio Inc.比较结果)



PCR 反应所需时间  
(35 Cycles) 2小时5分钟

### 根据实验目的和实验手法选择推荐的“Low DNA”酶!

- 对微生物进行高灵敏度检出时
- 对微量检测样品进行菌群分析时
- 想缩短 PCR 反应时间时
- 想使用简并引物时

TaKaRa Taq™ HS Low DNA

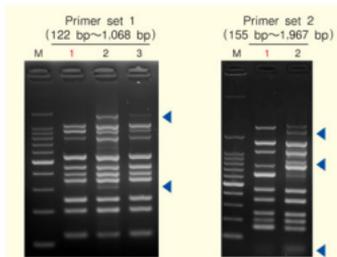
- 对微量基因组DNA进行高灵敏度的特异性扩增时
- 想对单细胞进行PCR扩增时
- GC rich、AT rich 模板难以扩增时
- 想进行无偏好性文库扩增时

Tks Gflex™ DNA Polymerase Low DNA

## Multiplex PCR Assay Kit Ver.2

本制品是高速Priming性DNA聚合酶与可提高引物退火特异性的反应液配套组成的Multiplex PCR用试剂盒，是进行多重PCR的专用试剂盒。与以往的多重PCR试剂盒相比，可实现在更短时间内进行特异性且扩增序列偏好性少的PCR反应。通过调整酶使用量和反应时间可进行200对引物的多重PCR反应。

### ■ 使用10种引物的多重PCR反应例



1 : Multiplex PCR Assay Kit Ver.2  
2 : K公司同类试剂盒  
3 : M公司同类试剂盒  
M : 100 bp DNA Ladder

◀ : 非特异性扩增产物

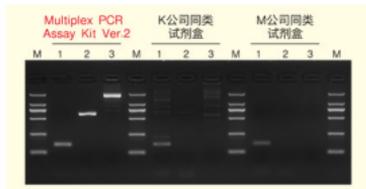
与其他公司同类产品相比,本制品可在更短时间内获得10种目的基因的特异性扩增片段。

	Multiplex PCR Assay Kit Ver.2	K公司同类试剂盒	M公司同类试剂盒
Preheat	94°C 1 min	95°C 3 min	95°C 15 min
PCR (30 Cycles)	94°C 30 sec	95°C 15 sec	95°C 30 sec
	57°C 30 sec	60°C 30 sec	60°C 90 sec
	72°C 30 sec (set 1) 60 sec (set 2)	72°C 30 sec (set 1) 120 sec (set 2)	72°C 90 sec (set 1) 120 sec (set 2)
Final extension	72°C 10 min	72°C 10 min	72°C 10 min
Total time	100 min (set 1) 115 min (set 2)	110 min (set 1) 140 min (set 2)	158 min (set 1) 188 min (set 2)

※使用TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)

(Takara Bio Inc.比较结果)

### ■ 高反应效率与高特异性兼具！在单一PCR反应中也发挥威力



1 : LRP5 155 bp  
2 : JUN 604 bp  
3 : TGFB1 2,004 bp  
M : DL2,000 DNA Marker

模板：人基因组DNA 100 ng/50 μl反应体系

使用各公司推荐反应条件：

使用易产生非特异性扩增产物的难以扩增的引物进行PCR反应时，可高特异性且高效率地对目的基因进行PCR扩增。

(Takara Bio Inc.比较结果)

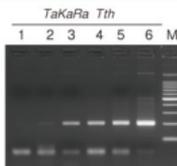
# TaKaRa Tth/TaKaRa Tth Hot Start Version

*Tth* DNA polymerase是把 *Thermus thermophilus* HB-8 DNA Polymerase的基因经过克隆转化到大肠杆菌中进行表达后，分离提取而得到的。它与天然*Tth* DNA聚合酶具有相同的功能。

本酶具备一般的耐热性DNA聚合酶特性，无3'-5' DNA外切酶活性，且在Mn<sup>2+</sup>存在的条件下，其即便在高温条件下也可以显示反转录活性。利用该特性，可用同一酶在同一管中进行反转录反应与PCR反应（1-STEP RT-PCR）。

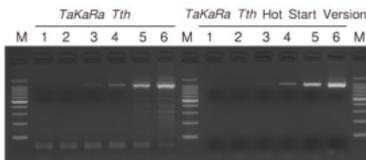
*TaKaRa Tth* Hot Start Version是抗*Tth*单克隆抗体和*TaKaRa Tth*的混合制品，适用于Hot Start PCR。高温加热前，抗*Tth*单克隆抗体与*Tth*酶结合，抑制其活性，从而抑制低温条件下由引物的非特异性退火或引物二聚体引起的非特异性扩增。

## ■ 性能：PCR扩增感度



【Target】 Human GAPDH gene (200 bp)

Lane	Template
1	灭菌水
2	Human genomic DNA 10 pg
3	Human genomic DNA 100 pg
4	Human genomic DNA 1 ng
5	Human genomic DNA 10 ng
6	Human genomic DNA 100 ng



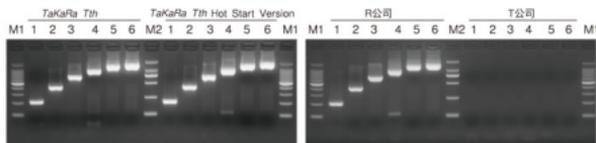
【Target】 Human DCARE1 gene (1.0 kb)

Lane	Template
1	灭菌水
2	Human genomic DNA 10 pg
3	Human genomic DNA 100 pg
4	Human genomic DNA 1 ng
5	Human genomic DNA 10 ng
6	Human genomic DNA 100 ng

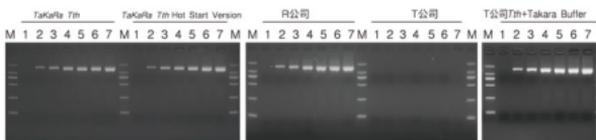
以Human genomic DNA为模板，对GAPDH gene, DCARE1 gene进行检测：

检出感度可以达到100 pg，且*TaKaRa Tth* Hot Start Version非特异性扩增产物少于*TaKaRa Tth*。

## Template: lambda DNA



Lane	Length (bp)
M1	100 bp DNA ladder
1	200 bp
2	400 bp
3	700 bp
4	1,000 bp
5	1,400 bp
6	1,600 bp
M2	DL2,000 DNA Marker



Lane	Template
M	DL2,000 DNA Marker
1	NTC
2	0.5 pg
3	5 pg
4	50 pg
5	500 pg
6	5 ng
7	50 ng

*TaKaRa Tth* /*Tth* HS扩增性能和R公司相当，T公司无扩增。

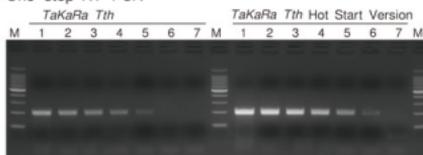
检出感度上，lambda 1.4 kb扩增，0.5 pg能够检出，T公司酶+Takara buffer扩增OK。

(Takara Bio Inc比较结果)

■ 性能: RT-PCR扩增(one-step & two-step RT-PCR)

目的基因: Human B2M gene (194 bp)

One-step RT-PCR



Lane	Template
1	HL60 total RNA 1 µg
2	HL60 total RNA 100 ng
3	HL60 total RNA 10 ng
4	HL60 total RNA 1 ng
5	HL60 total RNA 100 pg
6	HL60 total RNA 10 pg
7	NTC

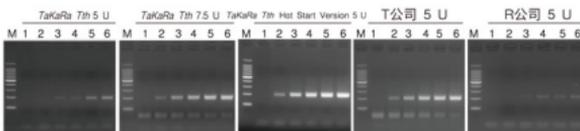
Two-step RT-PCR



Lane	Template
1	HL60 total RNA 200 ng
2	HL60 total RNA 20 ng
3	HL60 total RNA 2 ng
4	HL60 total RNA 200 pg
5	HL60 total RNA 20 pg
6	NTC

以HL60 total RNA为模板, 对human B2M gene进行检测:

TaKaRa Tth 检出敏感度 20 pg, TaKaRa Tth Hot Start Version 检出敏感度可以达到 10 pg。



Lane	Template
1	NTC
2	HL60 total RNA 10 pg
3	HL60 total RNA 20 ng
4	HL60 total RNA 1 ng
5	HL60 total RNA 10 ng
6	HL60 total RNA 100 ng

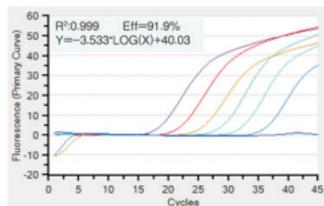
TaKaRa Tth/TaKaRa Tth Hot Start Version 扩增敏感度与T公司相当, 优于R公司。

(Takara Bio Inc.比较结果)

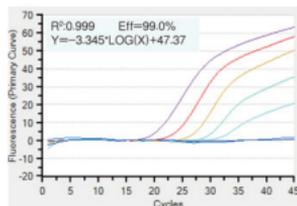
■ 性能: TaKaRa Tth Hot Start Version 进行 RT-qPCR 扩增

目的基因: Human GAPDH gene

Transcript RNA (template: lambda 4.4 kb)



GAPDH gene: HL60 total RNA: 100 ng~1 pg



Transcript RNA: 1 x 10<sup>8</sup> cps ~1 x 10<sup>4</sup> cps

以HL60 total RNA为模板, 使用 TaKaRa Tth Hot Start Version 扩增, 检出敏感度可以达到 1 pg。

以Transcript RNA为模板, 使用 TaKaRa Tth Hot Start Version 扩增, 检出敏感度可以达到 1 x 10<sup>4</sup> copies。

# Titanium<sup>®</sup> *Taq* DNA Polymerase

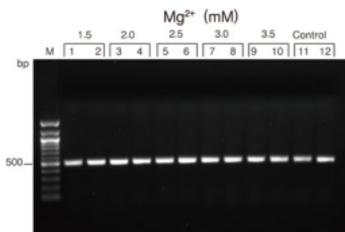
Titanium *Taq* DNA Polymerase 是用于广泛PCR应用的高度灵敏、强大的酶。它适用于任何DNA模板，包括细菌、质粒DNA、cDNA以及复杂基因组DNA。Titanium *Taq* 包括TaqStart抗体，可提高产物的特异性和产量。

Titanium *Taq* DNA Polymerase 缺乏野生型 *Taq* 的5' 外切核酸酶活性，这使得它比其他 *Taq* 聚合酶扩增性能更强大，并且可用于扩增高度复杂的DNA混合物。这种新型酶还包含精心设计的氨基酸替代物，增加其溶解度，使其成为高灵敏度的PCR聚合酶。

## ■ 产品特点

- 更短循环圈数即可扩增目的片段，同时降低背景
- 无需优化反应条件—Titanium *Taq* 可在广泛的Mg离子范围内进行扩增
- 可从高复杂模板中扩增2 kb靶基因。如人基因组DNA
- 可扩增珍贵或低拷贝基因

### 1. Activity of Titanium *Taq* over a wide range of Mg<sup>2+</sup> concentrations

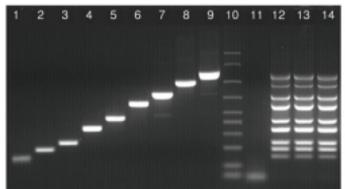


Titanium *Taq* was used to amplify a 500 bp region of Calf Thymus genomic DNA. The MgCl<sub>2</sub> concentration was varied as indicated. The enzyme performed consistently through the range of Mg<sup>2+</sup> used. Lane M: DNA size marker.

Titanium *Taq* is active over a wide range of Mg<sup>2+</sup> concentrations, which helps minimize time-spent on optimization.

Enables multiplexing where different Mg<sup>2+</sup> concentration is sometimes necessary for different targets.

### 2. Multiplexing with Titanium *Taq*



PCR reactions were performed using human genomic DNA as a template and primer pairs for nine different targets. Lanes 1–9 contain individual reactions for each primer pair amplified using Titanium *Taq*. Lanes 12–14 contain multiplex PCR reactions performed with all nine primer pairs in a single reaction. Lane 1: LRP5 (155 bp). Lane 2: KIT (201 bp). Lane 3: CCR5 (247 bp). Lane 4: GHR (353 bp). Lane 5: PIK3R1 (449 bp). Lane 6: F683/R1288 (604 bp). Lane 7: SPP1 (780 bp). Lane 8: RN3C1 (1,068 bp). Lane 9: IL12B (1,321 bp). Lane 10: Ladder 50–2,000 bp. Lane 11: no template control (negative control). Lanes 12–14: replicates of 9-plex PCR reaction.

Titanium *Taq* shows high efficiency and specificity in multiplex PCR.

# Advantage<sup>®</sup> 2 Polymerase Mix

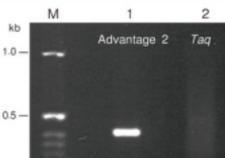
Advantage 2 Polymerase Mix is 优化的混合型聚合酶，用于长片段模板扩增或高保真和高品质的PCR实验。Advantage 2 是多功能混合型聚合酶，保真性是野生型 *Taq* 的3倍，适用于扩增多种类型的DNA模板包括cDNA。Advantage 2 混合型聚合酶包括：

1. Titanium *Taq* DNA Polymerase—高效率、高灵敏度的聚合酶，产量比 *Taq* 高。酶中含有热启动抗体，室温即可完成实验设置，并且提高了反应特异性。
2. Proofreading polymerase 少量的保真酶用于“long and accurate”地扩增长片段。

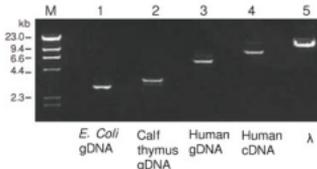
## ■ 产品特点

- 特别的混合型聚合酶，实现完美扩增——保真性是野生型 *Taq* 的3倍
- 高效、高灵敏度地扩增长达5 kb的目的DNA片段
- 预优化的缓冲液，无需优化反应条件
- 含有热启动抗体，可以在室温条件下设置实验，并提高了反应特异性

Advantage 2 is more sensitive than standard *Taq* and can amplify longer targets, up to 18 kb.



Amplification of a fragment of the rare tumor necrosis factor receptor II (TNFR II) cDNA with Advantage 2 Polymerase Mix and a competitor's *Taq* polymerase mix. 5  $\mu$ l of PCR products were run on a 1.1% agarose/EtBr gel. Lane 1: The 0.4-kb TNFR II fragment is readily obtained with Advantage 2. Lane 2: No product is seen with *Taq* polymerase. Lane M: DNA size marker



Amplification of various large templates using Advantage 2 Polymerase Mix. 1–3  $\mu$ l of each PCR product was run on a 1.1% agarose/EtBr gel. Lane 1: 2.5-kb *E. coli* DNA polymerase gene amplified from genomic DNA. Lane 2: 3.5-kb bovine pancreatic trypsin inhibitor gene amplified from calf thymus genomic DNA. Lane 3: 5.9-kb human IL-1 $\beta$  gene amplified from human genomic DNA. Lane 4: 8.5-kb human titin cDNA amplified from a SMART Human Skeletal Muscle cDNA library. Lane 5: 18.5-kb  $\lambda$  insert amplified from a  $\lambda$  clone. Lane M:  $\lambda$ /Hind III DNA size marker.

(Takara Bio USA, Inc比较结果)

## Titanium *Taq* and Advantage 2 summary

	Titanium <i>Taq</i>	Advantage 2
Enzyme	Engineered <i>Taq</i> lacking 5'–3'exonuclease activity	Titanium <i>Taq</i> + proof reader (think high fidelity Titanium <i>Taq</i> )
Features	High yield and sensitive	High yield and sensitive with enhanced fidelity
Applications	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multiplex PCR (eg genotyping, pathogen detection)</li> <li>• Rare targets (cfDNA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• cDNA amplification</li> <li>• Library prep</li> <li>• Rare targets (cfDNA)</li> </ul>
Amplicon size	<ul style="list-style-type: none"> <li>• gDNA 2 kb</li> <li>• Plasmid 2 kb</li> <li>• cDNA 4 kb</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• gDNA 6 kb</li> <li>• Plasmid 18 kb</li> <li>• cDNA 8.5 kb</li> </ul>
Hot-start	✓	✓
Lyophilized 2x premix	✓	✓
Glycerol-free	✓	–

## PrimeSTAR® 系列的基本特点

PrimeSTAR® 系列和其他各种 PCR 用聚合酶的保真性能比较



★对 PrimeSTAR® 系列各种 PCR 聚合酶的 PCR 扩增产物 (约 50 万个碱基) 进行测序后, 仅 10~30 个碱基发生了错配。  
PrimeSTAR® 系列的保真性高于 Pfu DNA Polymerase (早期的 High Fidelity PCR 酶)

错配率的计算方法: 以 GC rich、易发生碱基突变的 *T.thermophilus* HB8 为模板, 任选 10 个区域进行 PCR 扩增后, 将各自的 PCR 产物克隆至载体, 并对每种序列挑取复数的克隆进行测序确认碱基序列。

Takara Bio Inc 比较结果

酶	GC or AT rich 模板的扩增	延伸速度	模板添加量范围	扩增片段大小标准 (人基因组 DNA)	PCR 产物的末端形状	Hot Start
PrimeSTAR® HS	★★★★	★★★	★★★	≤8.5 kb	平滑末端	○ (使用抗体)
PrimeSTAR® Max	★★★★	★★★★★	★★★★★*	≤6 kb		
PrimeSTAR® GXL	★★★★★	★★★★★(*)**	★★★★★	≤30 kb		

\* 当延伸时间延长至 1 min/kb 时, 可以增加模板使用量。

\*\* 当酶的使用量提高至 2 倍时, 可进行延伸速度为 10 sec/kb 的高速 PCR 反应。

高通用性、高保真性、PCR 酶的新选择

## PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase

长链扩增

通用性高

反应速度快

PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase 是在 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 基础上进行改良的, 可抑制阻碍 PCR 反应的酶与模板 DNA 的非特异性结合, 同时与本公司特别研发的改良型延伸因子组合使用, 是 Takara 具有很好延伸性的高保真酶。

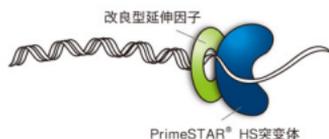
可简单地对以往高保真酶难以扩增的 GC rich 模板进行 PCR 扩增, 及从高浓度 cDNA 中检测出低表达量的基因等。

当酶的使用量提高至 2 倍时, 可进行延伸时间为 10 sec/kb 的高速 PCR 反应。

【扩增片段的标准】

λ DNA: ~40 kb

Human genome DNA: ~30 kb

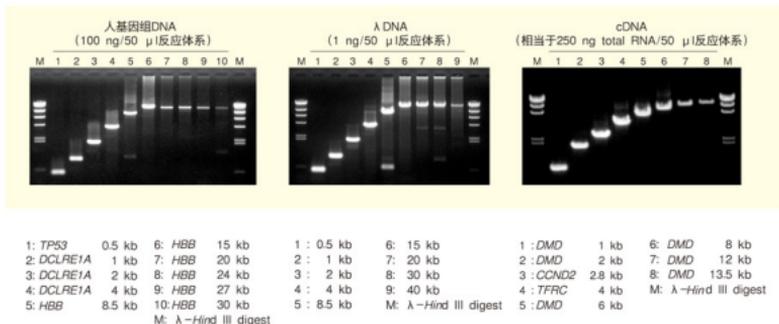


PrimeSTAR® HS 突变体

## ■ 长片段靶基因的扩增

评价PCR聚合酶的反应性能时，能够扩增长DNA是一个重要的项目。下面是以各种DNA为模板，使用PrimeSTAR® GXL对长片段靶基因的扩增进行了确认。

结果显示，以人基因组DNA为模板可获得30 kb、以λ DNA为模板可获得40 kb、以cDNA为模板可获得13.5 kb的扩增产物，显示出PrimeSTAR® GXL对各种靶基因都有良好的延伸性。

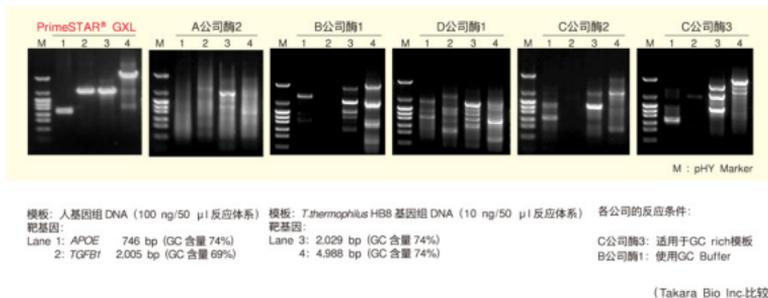


## ■ 扩增GC rich靶基因的反应性 (同其他公司High Fidelity PCR酶进行比较)

靶基因富含GC序列时，经常会导致PCR扩增难以进行。下面是使用本公司的酶与其他公司的PCR酶对难以扩增的GC rich模板进行PCR反应，对其反应性能进行了比较。

以人基因组DNA和*T.thermophilus* HB8基因组DNA为模板，对扩增区域GC含量为70%左右的4种GC rich模板分别使用PrimeSTAR® GXL与其他公司High Fidelity PCR酶，反应液的配制及PCR反应条件按照各自推荐的操作流程进行了PCR扩增。

结果显示，PrimeSTAR® GXL对GC rich模板可进行高效率的扩增，同时也显示出非常高的反应特异性。



提供高水平的保真性

## PrimeSTAR® Max DNA Polymerase

反应速度快

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase是兼具快速延伸性和高保真性的DNA聚合酶。利用酶自身的高priming效率和特别添加的延伸因子，可大幅缩短退火时间和延伸时间，实现了高速PCR反应。同时是PrimeSTAR®系列产品中保真性最高的DNA聚合酶。

保真性高

操作简便

【扩增片段的标准】

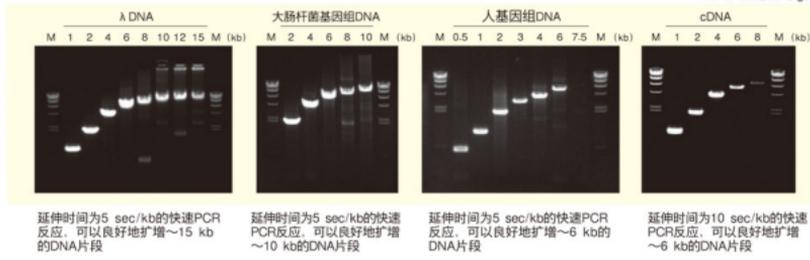
λ DNA: ~15 kb

Human genome DNA: ~6 kb

### ■ 使用各种模板可获得的DNA片段大小(快速PCR反应)

以λ DNA、大肠杆菌基因组DNA、人基因组DNA及cDNA为模板，退火时间设定为5 sec或15 sec，延伸时间设定为5 sec/kb（以cDNA为模板时设定为10 sec/kb），使用PrimeSTAR® Max确认可获得的DNA片段大小。

M: λ-Hind III digest



## PrimeSTAR® 系列的基础酶

## PrimeSTAR® HS DNA Polymerase

强校正能力

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase是兼具高保真性和高于*rTaq* DNA Polymerase扩增效率的High Fidelity PCR用DNA聚合酶。制品中添加了在常温状态下能够抑制DNA Polymerase活性及3'→5' Exonuclease活性的抗体，可进行高灵敏度、高特异性PCR反应。

高Priming效率

【扩增片段的标准】

λ DNA: ~28 kb

Human genome DNA: ~8.5 kb

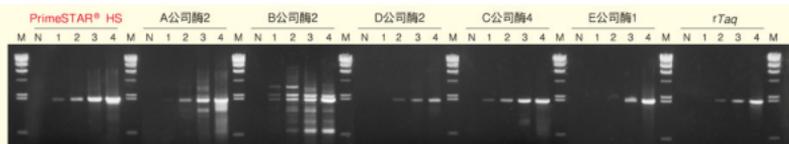
※ Priming效率

DNA Polymerase在引物的3'-末端形成酶/DNA复合物并开始DNA片段的延伸，这一过程称为Priming。任何一种PrimeSTAR®系列的聚合酶都具有高Priming效率。因此，在5~15秒短退火时间内可获得高特异性扩增产物。

经济性

### ■ PrimeSTAR® HS和各公司High Fidelity PCR酶扩增效率的比较

以人基因组DNA为模板，分别使用PrimeSTAR® HS和各公司高保真酶及*rTaq*，在各自的推荐条件下对PCR扩增效率进行了比较。结果显示，PrimeSTAR® HS同其他公司High Fidelity PCR酶相比，即使在模板量非常少的情况下也能高效率地扩增。



模板: 人基因组 DNA

靶基因: DCCLRE1A 基因 (2 kb)

反应液的配制及 PCR 反应条件: 使用各公司推荐的操作流程

PrimeSTAR® HS的反应条件: 98°C 10 sec  
55°C 5 sec  
72°C 2 min } 30 Cycles

模板使用量 (50 μl 反应体系)

Lane N: Negative Control (无模板)

1: 100 pg 2: 1 ng

3: 10 ng 4: 100 ng

M: λ-Hind III digest

(Takara Bio Inc比较结果)

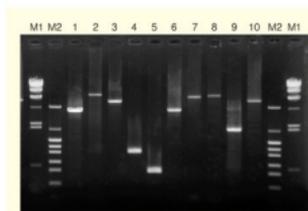
■ 在同一反应条件下使用PrimeSTAR® HS对各种片段大小不同的靶基因进行PCR扩增

使用PrimeSTAR® HS在同一PCR反应条件下对各种片段大小不同的靶基因进行了PCR扩增反应，结果显示，PrimeSTAR® HS对0.5~8.5 kb的靶基因都可高效率地进行扩增。

反应条件：  
98°C 10 sec  
68°C 8 min } 30 Cycles

靶基因：

Lane 1: DCLRE1A	4 kb	7: <i>HBB</i>	7.5 kb
2: $\beta$ -globin	8.5 kb	8: DCLRE1A	8 kb
3: $\beta$ -globin	6 kb	9: DCLRE1A	2 kb
4: DCLRE1A	1 kb	10: 7P53	6 kb
5: 7P53	0.5 kb	M1: $\lambda$ -Hind III digest	
6: 7P53	4 kb	M2: pHY Marker	



## PCR产物污染低风险！

PCR检测方法因其高灵敏度的特性，时常会发生被过去扩增的PCR产物污染而产生假阳性的现象。特别是采用End-point PCR方法，在食品、环境检测等方面应用时，由于相同的PCR反应重复操作而带来的危险性更高，给结果判定造成很大影响，令人头疼。

持续使用 **TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG plus**，能够防止PCR产物污染造成的假阳性，提升基因检测的可信度。

使用含有dUTP替代dTTP的基质进行PCR扩增，其扩增产物嵌入了尿嘧啶碱基。

针对这种扩增产物的污染，用 **Uracil-N-glycosylase (UNG)** 处理，再进行PCR反应，含有尿嘧啶的污染的扩增产物被降解，而只有不含尿嘧啶的检测样品来源的DNA才能够作为模板被扩增。

防止假阳性的产生！

### 实验例1：UNG对防止PCR产物污染的效果

#### 配制反应液

TaKaRa Taq™ HS (5 U/μl)	0.25 μl
10 × PCR Buffer for UNG plus	5 μl
dU plus dNTP Mixture (12.5 ×)	4 μl
UNG (2 U/μl)	0.5 μl

添加模板、引物、灭菌水至50 μl。

置于PCR仪中，按以下条件进行反应。

25°C 10分	(UNG处理)	} 30 Cycles
95°C 2分	(UNG热失活)	
98°C 10秒		
55°C 30秒		
72°C 1分		

UNG处理条件不因目的基因序列、长度等进行改变，但PCR反应条件需要根据目的基因的情况进行适当调整。

#### 【方法】

按照本制品的操作方法，以10 ng基因组DNA为模板，进行约500 bp的PCR扩增(1st PCR)。再以1st PCR扩增产物2 μl为模板，UNG处理有或无，重复1st PCR(2nd PCR)，确认UNG对防止PCR产物污染的效果。

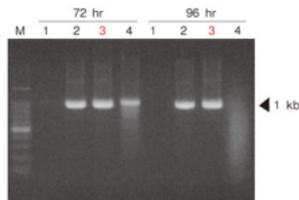


#### 【结果】

有UNG处理时，1st PCR产物经UNG处理而降解，因此2nd PCR无PCR扩增产物检出。

## 实验例2: PCR扩增产物的稳定性

为防止PCR产物污染的影响而使用UNG的反应体系, 也会时常出现因UNG的失活不完全而使扩增产物被分解导致错误的检测结果的情况。对于微量目的基因的扩增, 其扩增产物量少, 要尤为注意。本制品使用的热敏感UNG经50°C、10分钟的热处理, 可以得到完全且不可逆的失活。即使加入了过剩的UNG, 在PCR循环前的95°C、2分钟变性步骤也能够完全失活。



【方法】同时进行了扩增人基因组DNA约1 kb的目的基因片段与其他公司热敏感UNG (按制品的推荐量添加) 的比较实验。PCR反应后, 将反应液25°C、72小时或96小时保温放置, 比较残存的UNG活性对PCR产物的影响。

- Lane 1. Control (不添加模板)  
 2. 不添加UNG  
 3. 使用本制品的UNG  
 4. 使用其它公司热敏感UNG  
 M. 100 bp DNA Ladder

PCR条件: 25°C 10分 (UNG处理)  
 95°C 2分 (UNG热失活)  
 98°C 10秒  
 55°C 30秒  
 72°C 1分

35 Cycles

【结果】添加本Kit中的UNG (Uracil DNA Glycosylase (UNG), heat-labile) 的反应体系, 室温放置96小时之后, 扩增产物也没有被降解。

(Takara Bio Inc比较结果)

## 实验例3: 与常规PCR反应体系扩增效率的比较

【方法】使用肠出血性大肠杆菌VT1基因检出用Primer Set (Code No. S006) 以及沙门氏菌invA基因检出用Primer Set (Code No. S018), 对本制品和TaKaRa Taq™ HS (常规PCR反应体系) 的扩增效率进行了比较。

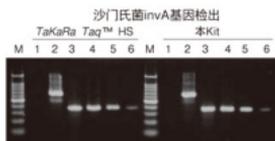
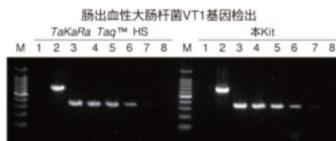
(右上图: 肠出血性大肠杆菌VT1) (右下图: 沙门氏菌invA)

※以精制的基因组DNA为模板

- lane 1. 不添加模板  
 2. Positive Control EC2 (Code No. S033)  
 3. 10 ng 基因组DNA  
 4. 1 ng 基因组DNA  
 5. 100 pg 基因组DNA  
 6. 10 pg 基因组DNA  
 7. 1 pg 基因组DNA  
 8. 100 fg 基因组DNA  
 M. 100 bp DNA Ladder

※以菌体热提取物为模板

- lane 1. 不添加模板  
 2. Positive Control SN (Code No. S040)  
 3. 100,000 cfu 相当量的基因组DNA  
 4. 10,000 cfu 相当量的基因组DNA  
 5. 1,000 cfu 相当量的基因组DNA  
 6. 100 cfu 相当量的基因组DNA  
 M. 100 bp DNA Ladder



【结果】结果显示, 使用本Kit UNG处理用反应体系和使用TaKaRa Taq™ HS的常规PCR反应体系具有同等的扩增效率。

★ 肠出血性大肠杆菌、沙门氏菌之外的微生物检测用引物的详细信息请访问本公司网站查询。

产品名称
TaKaRa Taq™ HS PCR Kit. UNG plus
TaKaRa PCR Carryover Prevention Kit
Uracil DNA Glycosylase (UNG), heat-labile
dU plus dNTP Mixture (12.5 × )

# 高性能反转录酶系列

	普通cDNA合成	普通cDNA合成	高品质全长cDNA合成
制品名称	Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-)	PrimeScript™ Reverse Transcriptase	PrimeScript™ II Reverse Transcriptase
特点·用途	<ul style="list-style-type: none"> <li>通过基因重组技术克隆表达的缺失突变型RNase H-的M-MLV反转录酶</li> <li>本酶M-MLV (RNase H-) 的RNase H活性缺失, 延伸能力强, 可用于较长的cDNA合成以及高比例的全长cDNA文库的构建等</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>通过PrimeScript RTase的置换延伸活性可以合成背景很低的cDNA</li> <li>延伸性强</li> <li>高级结构的RNA也可以使用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>通过添加辅助蛋白质, 有效抑制了非特异性的延伸反应, 实现了低背景率的cDNA合成</li> <li>尤其适用于长链RNA起始的全长cDNA的合成</li> </ul>
高品质cDNA合成	★	★★	★★★
对反应障碍物的抗性	★	★★	★★★
延伸性/扩增链长	~13.5 kb	~13.5 kb	~13.5 kb
反应温度	42℃	42℃	42℃
反应时间	30~60分	30~60分	30~60分

※各酶不含有RNase H活性, 不会阻碍mRNA起始cDNA的合成。

## Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-)

本制品是通过基因重组技术克隆表达的缺失突变型RNase H-的M-MLV反转录酶。本酶M-MLV (RNase H-) 的RNase H活性缺失, 延伸能力强, 可用于较长的cDNA合成以及高比例的全长cDNA文库的构建等。

### 【 Real Time PCR 反应 】

Target: Mouse GAPDH.

Template: Mouse Liver Total RNA 经反转录反应后的cDNA溶液。

使用EASY Dilution (for Real Time PCR) (Code No. 9160) 将cDNA溶液按 $10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$ 倍梯度稀释 (10倍梯度稀释) 后, 各取2  $\mu$ l进行Real Time PCR反应。此时25  $\mu$ l PCR反应液中的cDNA添加量分别相当于从100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg的Total RNA反转录得到的cDNA量。

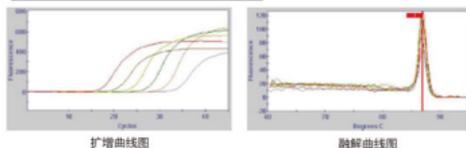
Negative Control的模板使用了灭菌水。

扩增长度: 108 bp。

使用仪器: Smart Cycler System。

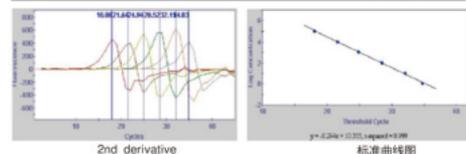
检测方法: 嵌合荧光法。

Real Time PCR扩增曲线图及融解曲线图如下:



本实验检测到了Mouse Liver Total RNA 1 pg~100 ng相当量的cDNA。分析融解曲线可知, 无论哪一种浓度的模板都能够得到单一的PCR扩增产物。同时标准曲线的线性关系良好, 在实验浓度范围内能够进行准确定量。

反应结束后, 根据扩增曲线的2nd derivative得到各扩增曲线的Ct值, 制作标准曲线。



具有很高的延伸性，适用于复杂结构及长链RNA

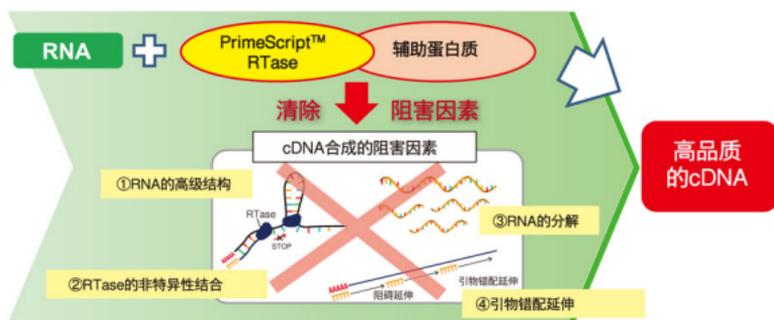
## PrimeScript™ Reverse Transcriptase

- 可以进行高质量的cDNA合成
- 非常强的延伸能力
- 42℃反应(降低mRNA分解)
- 对复杂的高级结构RNA也可进行反应

可实现从polyA开始合成高质量的cDNA!!



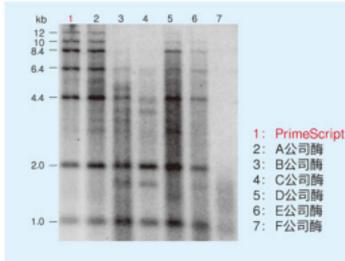
反转录反应



PrimeScript™ Reverse Transcriptase (RTase) 是Takara Bio在M-MLV来源的反转录酶的基础上特别开发的一种全新反转录酶。

该酶大大降低了cDNA合成的最大阻碍，即反转录酶本身对于RNA的非特异结合，同时提高了反转录引物的特异性。通过以上两个特点与本酶具有的强置换延伸活性，在对RNA损伤很小的42℃条件下，对于结构复杂的RNA及长链RNA也能够合成低背景的cDNA。

### ◆ 可以合成高质量的cDNA



PrimeScript RTase在42℃下反应能够很好的合成cDNA。

以RNA Ladder (1、2、4.4、6.4、8.4、10、12 kb) 为模板，分别使用PrimeScript RTase及各公司反转录酶进行1st strand cDNA合成，取一定量的cDNA进行变性凝胶电泳后，SYBR Green II染色，再利用荧光图像分析仪FMBIO II进行检出。使用各公司推荐的条件进行反应。

结果表明，PrimeScript RTase不仅能够合成短链cDNA，也能合成长链cDNA，且合成的cDNA背景很低，即可以合成全长比例很高的高品质cDNA。

(Takara Bio Inc 比较结果)

## PrimeScript™ II Reverse Transcriptase

PrimeScript™ II RTase是PrimeScript™ RTase添加辅助蛋白质而形成的改良品，能够很好的抑制cDNA合成的阻害因素。尤其是使用Oligo dT引物的polyA延伸反应，能够得到低背景高质量的全长cDNA产物。

### ◆ 可以合成高质量的长链cDNA

#### 评价实验1：长链cDNA合成的比较

##### 【方法】

以人心脏来源的1 μg total RNA为模板，使用Oligo dT Primer进行cDNA合成。使用PrimeSTAR GXL对Dystrophin基因polyA附近开始长达6,930个碱基（下图区域①）的长链cDNA进行了Real-Time PCR测定。



##### 【结果】

PrimeScript II RTase相对于PrimeScript RTase显示了更好的长链延伸性。另外，PrimeScript RTase和PrimeScript II RTase反转录反应5分钟的cDNA合成量已经超出cDNA最大合成量的70%，同A公司酶相比，显示了更好的cDNA合成速度。

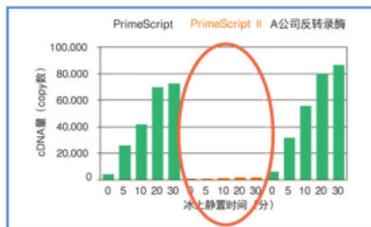
(Takara Bio Inc比较结果)

### ◆ 有效抑制由于引物错配引起的背景

#### 评价实验2：除polyA外的非特异性延伸产物量（背景）的测定

##### 【方法】

以人心脏来源的1 μg total RNA为模板，使用Oligo dT Primer在冰上配置cDNA合成所需的反应液。配好后将反应液冰上放置0~30分钟后，不进行反转录反应直接95°C加热停止反应。以上述反应液为模板，对Dystrophin基因区域②（polyA开始距离7,327个碱基后的139个碱基；见下图）的cDNA进行Real Time PCR测定。



##### 【结果】

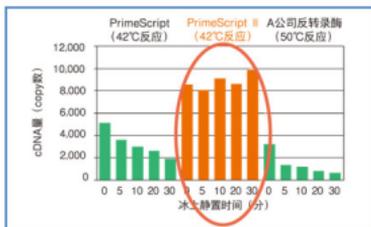
PrimeScript RTase与A公司反转录酶，随着反应液在冰上放置时间的增长，除polyA以外来源的非特异的产物增加（实验2），相反之后的反转录反应polyA起始的长链延伸产物量减少（实验3）。

由此推测背景的产生会抑制cDNA的合成。而使用PrimeScript II RTase配置的反应液在冰上的放置时间不会使polyA以外的非特异性的产物增加（实验2），之后经polyA进行反转录反应，cDNA的合成也没有受到抑制（实验3）。由此可知使用PrimeScript II RTase经polyA起始的cDNA合成，能得到背景低且全长比例高的高品质cDNA。

#### 评价实验3：起始于polyA的长链cDNA的合成，冰上放置时间对cDNA合成的抑制程度？

##### 【方法】

将与评价实验2相同的cDNA合成反应液置于冰上放置，放置0~30分钟后以各自推荐的条件进行反转录反应，加热至95°C终止反应。以此反应液为模板，使用PrimeSTAR GXL对Dystrophin基因区域③（polyA开始6,930个碱基；下图）的cDNA进行Real Time PCR的测定。



! PrimeScript™ II RTase 配置好反应液后，冰上放置至反应开始即使有时间间隔，cDNA的合成也不会受到影响。

(Takara Bio Inc比较结果)

品名	浓度	说明
dATP、dGTP、dCTP、dTTP、dUTP	100 mM	
dNTP	2.5 mM / 10 mM	可订制高浓度

#### ◆ 质量标准

- 质量大于98%
- 经检测确认，用于PCR反应时扩增良好
- 经检测确认，不含有RNase

#### ◆ 稳定性

自收到之日起，适当条件下保存，两年内有效。

#### ◆ 质量控制

No	项目	dNTP、dATP、dGTP、dCTP、dTTP	dUTP
1	形态	水溶液 (Na盐)	Na盐溶液
2	pH	pH7~9	pH7~9
3	纯度	≥98%	≥98%
4	PCR 检定	(1)以λ DNA为模板进行PCR反应 (扩增产物500 bp~20 kb)，确认扩增状况良好。 (2)以HL60细胞的RNA为模板，对TFR区域进行RT-PCR反应 (扩增片段4.4 kb)，确认扩增状况良好。	使用 TaKaRa Taq Hot Start Version，以λ DNA为模板可很好地扩增8 kb的DNA片段。

## Recombinant RNase Inhibitor

本制品是通过亲和色谱等方法从大肠杆菌中纯化的猪肝RNA酶抑制剂得到的重组体。该酶的特征与猪肝和人胎盘来源的此类酶相似，与RNase A形成1:1复合物，抑制RNase活性。该反应是可逆的，通过尿素及巯基类试剂能够解离复合物，使RNase复活而抑制剂不可逆失活。使用时可直接加入含有RNA的反应液中。本品属蛋白质性质，与其它竞争性抑制剂（核酸类、无机磷酸类）不同，可以很容易地通过苯酚处理将其从反应体系中除去。但不能抑制反转录酶的RNase H的活性。本品具有与猪肝和人胎盘来源的酶相同的应用。

#### ■ 用途

1. cDNA合成反应 (Ribonuclease Inhibitor, 反应量0.5 U/μl)。
2. 体外翻译 (Ribonuclease Inhibitor, 反应量1 U/μl)。
3. 体外无细胞系统转录 (Ribonuclease Inhibitor, 反应量20 U/μl)。
4. SP6或T7 RNA聚合酶的体外转录 (Ribonuclease Inhibitor, 反应量1 U/μl)。
5. 多核糖体分离(RNase Inhibitor, 反应量1 U/μl)。

## 2 step Real Time RT-PCR用

- 用于快速反应的探针法检出试剂

Probe qPCR Mix (or with UNG)

- 用于快速反应、双标记荧光探针检出专用试剂

Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)

## 1 step Real Time RT-PCR用

- 适用于病毒、细菌快速检出的1 Step RT-qPCR Premix 试剂

One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix  
(or with UNG)

- 活体样品起始, 简便快速进行 Real Time PCR 检测

PrimeDirect™ Probe RT-qPCR Mix (or with UNG)

- 适用于探针法检测的1 Step Real Time RT-PCR用试剂

One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit  
(Perfect Real Time)

## Probe qPCR Mix (or with UNG)

- 增强了对PCR 阻害物的抵抗性

在进行食品和环境来源样品的靶基因DNA 检测及基因分型时,受PCR 反应阻害物影响导致检测灵敏度下降及假阴性结果困扰的研究人员请一定尝试使用

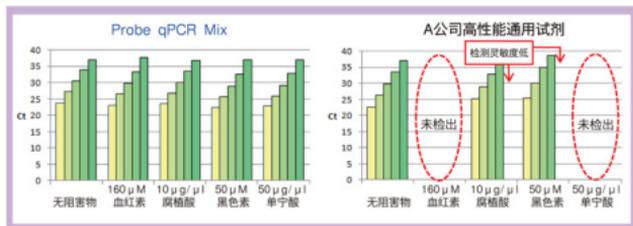
- 适用于快速qPCR 反应条件

已证实使用各公司qPCR 扩增仪均可以进行良好的扩增反应。即使在反应时间为40 分钟快速PCR 反应条件下也可获得重复性高的PCR 结果

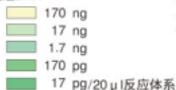
### ■ 各种PCR 阻害物对Ct 值的影响评价

已知血红素(血液成分)、腐植酸(土壤成分)、黑色素(皮肤和毛发成分)、单宁酸(植物成分)对PCR 反应有很强的阻害作用。对在PCR 反应中添加PCR 阻害物的反应体系和未添加PCR 阻害物的反应体系进行了Ct 值比较。

本制品同其他公司同类制品相比,对PCR 阻害物的抵抗性显著提高。使用目前为止不能获得良好反应结果的检测样品也能够获得高成功率、高检测灵敏度的PCR 反应。



模板: HL60基因组DNA



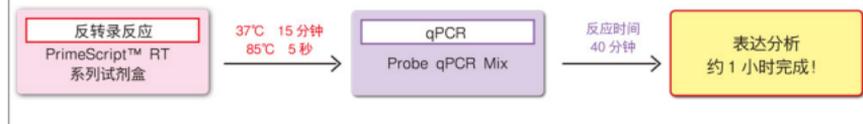
- 靶基因 : 人ACTB(使用 Dual Labeled Probe)
- qPCR扩增仪 : ABI 7500 Fast System
- qPCR反应条件: 95°C 20 sec  
95°C 3 sec  
60°C 30 sec } 40 cycles

反应时间: 39分钟

(Takara Bio Inc 比较结果)

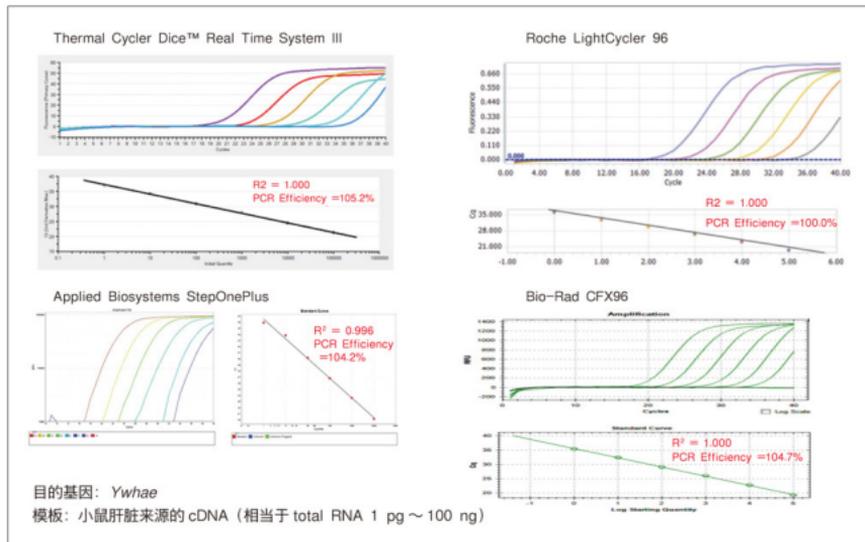
### ■ 表达分析时间大幅缩短

PrimeScript™ RT 系列试剂盒与该制品组合使用,可以实现更快速的实验。



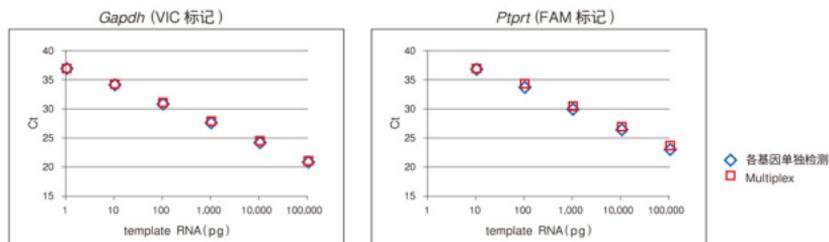
# Probe qPCR Mix (or with UNG)

## ■ 在各种 Real Time PCR 仪上反应稳定



## ■ multiplex PCR 分析实验例

小鼠肝脏来源的 cDNA 稀释液作为模板, 分别单独检测 *Gapdh* 和 *Ptprf* 基因, 与 multiplex qPCR 进行比较实验。经过确认, multiplex qPCR 与单独检测可获得相同的定量结果。



Primer/probe: Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assays

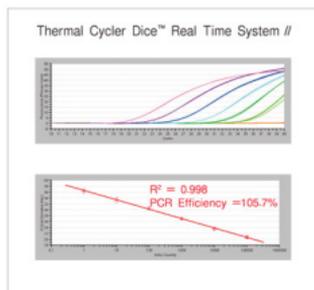
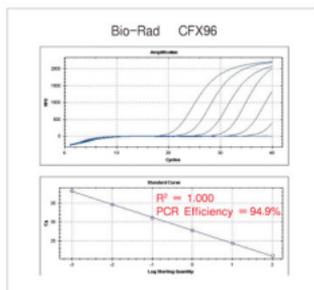
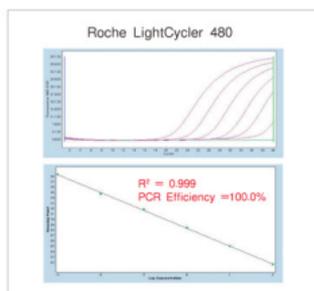
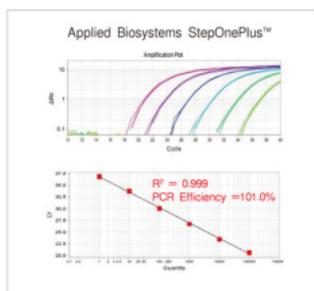
模板: 小鼠来源的 cDNA (相当于 total RNA 1  $\mu$ g ~ 100 ng)

qPCR 仪器: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System

## Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)

- 高准确性和宽广的使用范围
- 可进行快速 Real Time PCR  
与 PrimeScript™ RT 试剂盒组合使用, 可缩短基因表达解析所需时间
- 2×Premix 试剂中添加了耐热性 RNaseH  
以 cDNA 为模板时, 可很好地抑制残留 mRNA 对 PCR 反应的阻碍作用

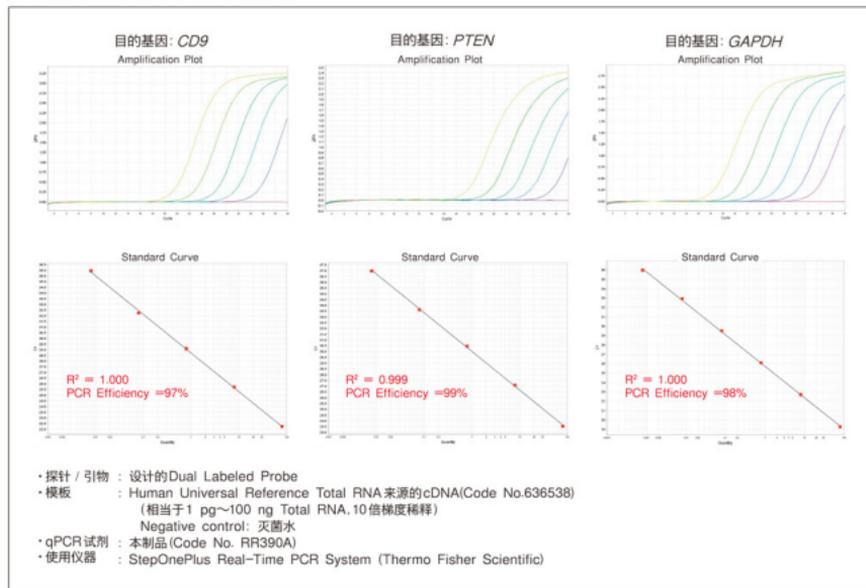
<在各种 Real Time PCR 仪上反应稳定>



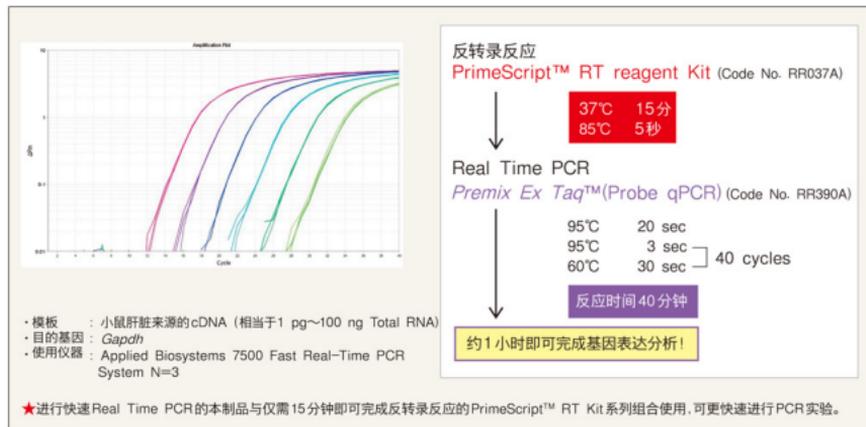
- 模板 : 小鼠肝脏来源的 cDNA (相当于 1 pg~100 ng Total RNA)
- 目的基因 : *Ywhae*
- qPCR 试剂 : 本制品 (Code No. RR390A)

# Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)

## ■ 使用Dual Labeled Probe检测例



## ■ 可缩短基因表达解析所需时间

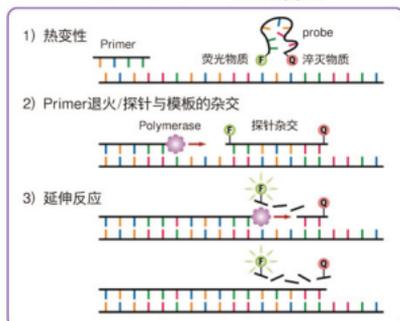


## One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix (or with UNG)

# One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix, with UNG

- 新开发的反转录酶 PrimeScript™ III RTase 与 PCR 酶、Buffer 制成的 Premix，只需要加入 Primer、Probe 以及待检测样品的简单操作即可完成实验
- 对含有反应阻害物的样品及粗提的 RNA 也能够高灵敏度的检出目的基因
- 可对应多个基因同时检出的多重反应
- 新增 UNG 版本,可防止假阳性产生

### Real Time PCR Probe法的原理



### 简便的操作流程

1 加入 One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix、Primer 及 Probe，使用 RNase Free H<sub>2</sub>O 补齐



2 加入粗提的 RNA 等样品

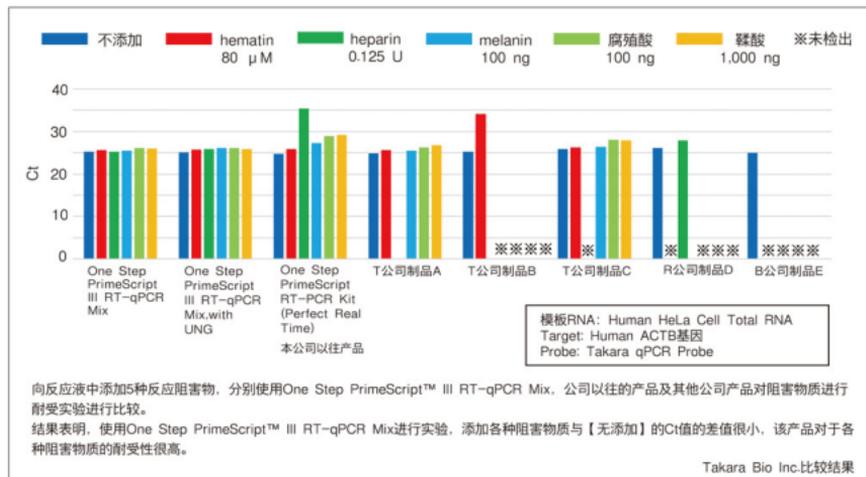


3 放入 Real Time PCR 仪中反应

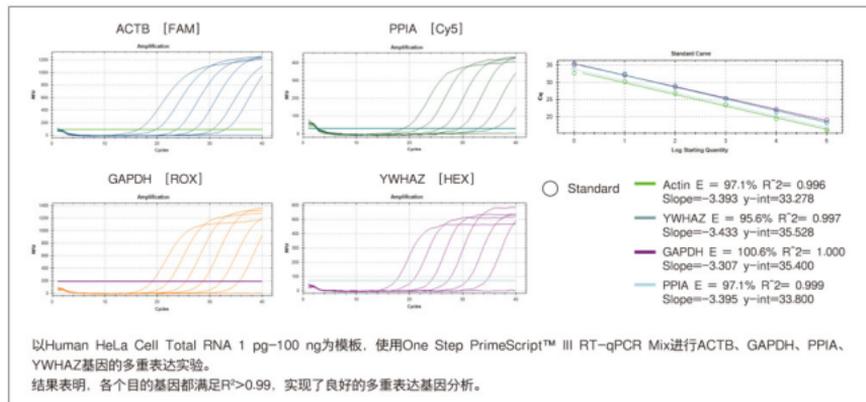


# One Step PrimeScript™ III RT-qPCR Mix (or with UNG)

## ■ 反应阻害物质耐受实验



## ■ 多重表达分析



## PrimeDirect™ Probe RT-qPCR Mix (or with UNG)

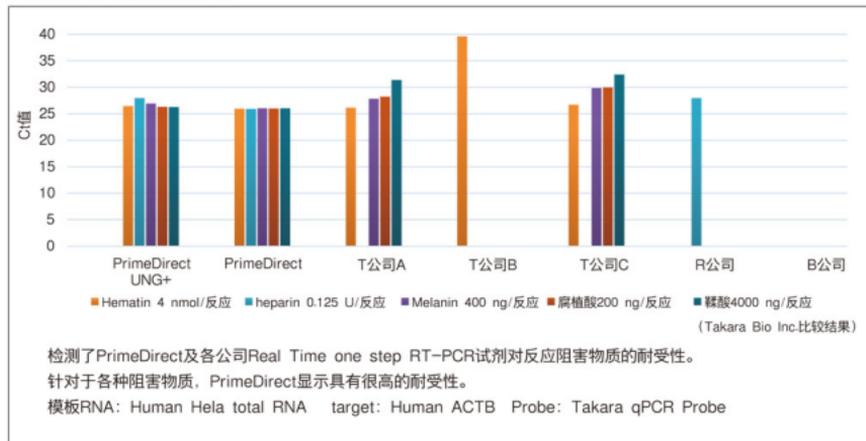
### PrimeDirect™ Probe RT-qPCR Mix PrimeDirect™ Probe RT-qPCR Mix, with UNG

- 探针法 one step RT-qPCR premix 试剂
  - 血液、尿液等样品无需RNA纯化也可进行Real Time PCR
  - 通过UNG的作用,可以有效防止carryover contamination产生的假阳性
- ※使用PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix,with UNG时

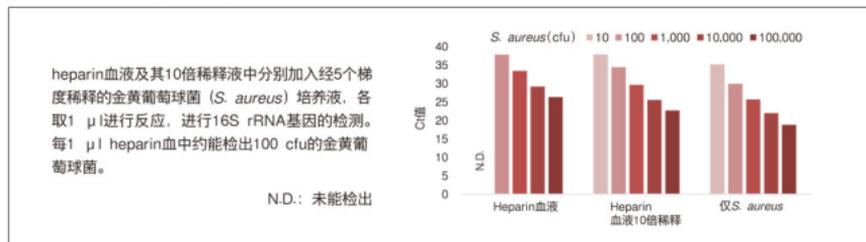


# PrimeDirect™ Probe RT-qPCR Mix (or with UNG)

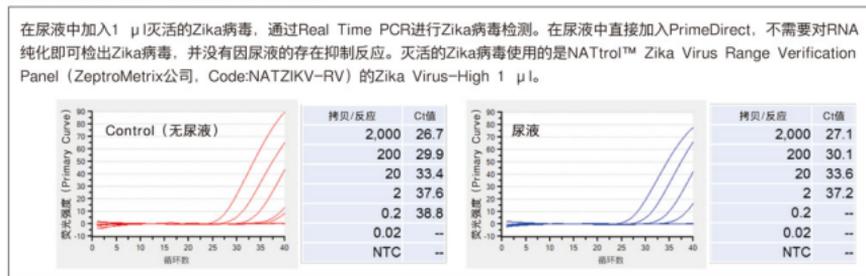
## ■ 对各种有害物质的高耐受性



## ■ 全血中金黄葡萄球菌的检出



## ■ 尿液样本中Zika病毒(RNA病毒)的检出



# One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)

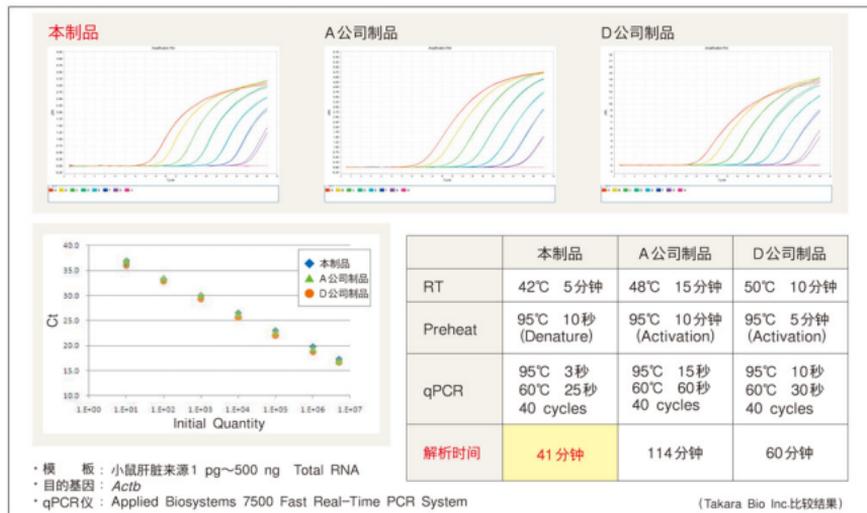
- 1 step 反应, 操作简单

适用于样品数量多及需要防止污染的基因检测等

- 可对低表达 mRNA 进行高灵敏度检测

同 2 step RT-PCR 相比, 1 step RT-PCR 可使用的 total RNA 量多, 模板损耗少, 可高效对低表达 mRNA 进行分型, 有利于特定基因的高灵敏度检测

- 同其他公司制品相比可在短时间内完成 PCR 分析



- 已确认在各种仪器的反应性能

已证实, 本制品使用下面的各种 Real Time PCR 仪器可获得良好的反应性能。

- Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- LightCycler480 (Roche Diagnostics)
- CFX96/MyiQ2 (Bio-Rad Laboratories)
- Thermal Cycler Dice™ Real Time System III/Lite
- Smart Cycler II System (Cepheid)



## 1. 单标修饰

种类	代码	5'	3'	Internal
Alexa Fluor 488	(Alexa 488)	✓	✓	-
ATTO 488	(ATTO 488)	✓	✓	-
Biotin	(Biotin)	✓	✓	-
Bodipy 493/503	(Bodipy493/503)	✓	✓	-
Bodipy 650/665	(Bodipy 650/665)	✓	-	-
BHQ1	(BHQ1)	-	✓	-
BHQ2	(BHQ2)	-	✓	-
BHQ3	(BHQ3)	-	✓	-
Cyanine 3	(Cy3)	✓	✓	-
Cyanine 5	(Cy5)	✓	✓	-
Cyanine 5.5	(Cy5.5)	✓	✓	-
Digoxin	(Digoxin)	✓	✓	-
DyLight 680	(DyLight 680)	✓	✓	-
DyLight 750	(DyLight 750)	✓	✓	-
DyLight 800	(DyLight 800)	✓	✓	-
FITC	(FITC)	✓	✓	-
6-FAM	(FAM)	✓	✓	-
HEX	(HEX)	✓	✓	-
JOE	(JOE)	✓	✓	-
Rhodamine Green	(Rhodamine Green)	✓	✓	-
ROX(X-rhodamine)	(ROX)	✓	✓	-
TAMRA(Tetramethylrhodamine)	(TAMRA)	✓	✓	-
TET	(TET)	✓	✓	-
Texas Red-X	(Texas Red-X)	✓	✓	-
Texas Red (Sulforhodamine 101 )	(Texas Red)	✓	✓	-

## 2. 分子信标

5' 标记	3' 标记
FAM, TET, JOE, HEX, TAMRA, ROX, Cyanine 5	DABCYL

## 3. 双标记荧光探针

5' 标记	3' 标记
FAM, TET, JOE, HEX	TAMRA
FAM, TET, JOE, HEX	BHQ1
TAMRA, ROX, Texas Red, Cyanine 3, Cyanine 5	BHQ2
Cyanine 5	BHQ3
FAM, TET, JOE, HEX, TAMRA, ROX, Cyanine 3, Cyanine 5	MGB-X

\* 修饰种类在不断的增加，还可以对客户提供的试剂进行订制服务。

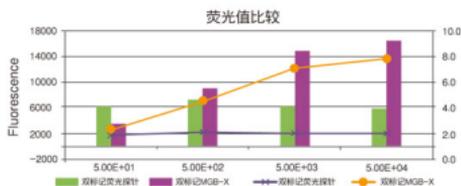
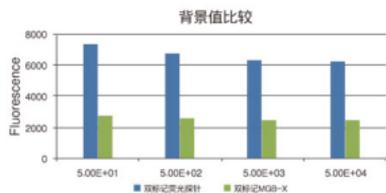


## 双标记 MGB-X 探针

双标记MGB-X探针，在3'末端结合了MGB-X，其与DNA的双螺旋的小沟契合，通过结合DNA双螺旋结构的稳定性来提高杂交的稳定性和准确性。该探针5'末端包含一个报告基团，3'末端使用非荧光淬灭剂，大大降低了荧光本底，提高了反应的灵敏性，同时MGB-X探针具有高度特异性，因此可用于很多遗传复杂性较高的应用领域。

- ◆ **显著提高Tm值：** MGB-X的结构特征可以有效提高探针的Tm值，与模板稳定结合，特异性更强，结果更准确。
- ◆ **探针设计更短：** 相较于传统双标记荧光探针，MGB-X探针可以设计的更短，尤其对于富含AT的序列设计。
- ◆ **更低背景荧光：** 该探针使用非荧光淬灭基团，且序列更短，使得报告基团和淬灭基团距离更近，荧光本底更低，大大提高了灵敏性和准确度。

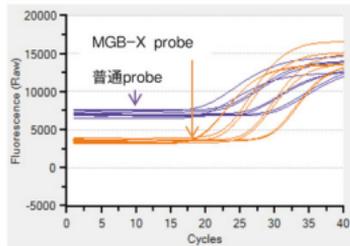
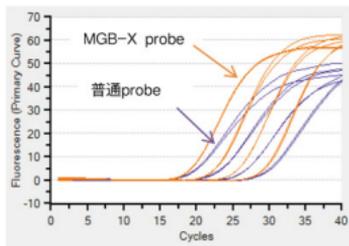
与传统双标记荧光探针相比，MGB-X探针荧光本底更低，荧光信号更强：



### 应用例

#### MGB-X Probe在基因检测中的应用

使用Takara MGB-X探针及其相应的引物对Norovirus GI型进行检测（下图），其最终的荧光信号值明显高于普通的双标记荧光探针。

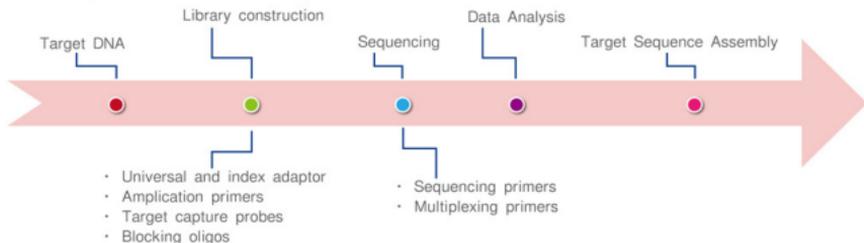


## NGS Oligos (Next-Generation Sequencing oligo)

下一代测序 (NGS) 技术迅速发展, 正逐渐成为遗传学研究和发现领域不可或缺的一部分。在过去的10年中, 测序的数据量增加了100-1000倍, 人类基因组测序成本大幅降低。该技术不仅广泛应用于遗传分析, 而且加速推进在研究、临床和应用市场领域的进展。与此同时, 也引发了对高质量高性能的相关原料的需求, 尤其是NGS引物。高纯度高质量的NGS Oligos是您获得准确的NGS实验结果的基础。Takara Oligo合成技术团队, 集多年Oligo合成的丰富经验, 致力于提供高质量的NGS Oligo, 制品均经过100%质谱分析和PAGE检测, 有效监控质量, 提供放心保证。

- 专门的设备和经验丰富的技术人员
- 特别的防污染工艺, 有效防止交叉污染
- 100%进行PAGE检测和质谱分析, 切实监控样品准确性和纯度
- 96 well Plate 或者离心管包装任选, 方便使用

除了接头(adaptor)以外, 测序平台还使用其它Oligo, 例如Amplification primers等, 它们对交叉污染的要求没有接头(adaptor)高, 因此, 按照常规Oligo进行订制即可。



## Locked Nucleic Acid

Locked Nucleic Acid是一种核酸类似物, 在结构上具有以五碳糖上的2'氧原子与4'C原子所形成的亚甲基桥的特征, 使Locked Nucleic Acid不仅可以与DNA或RNA互补序列形成双链, 且所形成的双链较以往更加稳定, 其物理性质与一般核酸非常相似。

许多文献均指出, 在一般探针、引物或者siRNA中的部分序列以Locked Nucleic Acid取代, 可提升引物、探针或者siRNA的亲合性、专一性与稳定性。

当与互补的DNA或者RNA链杂交时, Locked Nucleic Acid表现出前所未有的热稳定性。对于每一个嵌入的Locked Nucleic Acid单元, 其双链的Tm值可增加2-8°C。因此, 设计的引物探针的长度可以比传统的DNA或者RNA序列更短, 但是它还能保持高的Tm值, 当用于检测小的靶序列或者很相似的靶序列时, 这一点尤为重要。

- 可以通过改变寡核苷酸中Locked Nucleic Acid含量来提高其灵敏度与特异性。将Locked Nucleic Acid嵌入到寡核苷酸已被证明可以改善许多基于杂交技术的灵敏度与特异性, 包括PCR、微阵列与原位杂交 (ISH)。
- 当Locked Nucleic Acid碱基像A与T那样互补时, Tm值增大, 相反, 像A和C那样错配时Tm值会明显降低。因此, 一个碱基的差异会使Tm值出现较大变化, 所以Locked Nucleic Acid探针对于SNP分型非常有用。
- 对于具有低熔点的AT丰富的寡核苷酸, 更多的Locked Nucleic Acid碱基嵌入到寡核苷酸可提高其双链的Tm值。

## 荧光染料相关信息

### ■ 相关染料的光谱学性质与数据

双标记探针的荧光报告基团和淬灭基团适配表：

荧光基团	最大激发波长 (nm)	最大发射波长 (nm)	推荐选择的淬灭基团					
			BHQ1	BHQ2	BHQ3	DABCYL	MGB-X	TAMRA
			480-580 (534)	560-670 (579)	620-730 (672)	400-525 (453)	390-625 (522)	470-560 (544)
AMCA	353	422				✓	✓	
FAM	494	518	✓			✓	✓	✓
Alexa Fluor 488	495	519	✓				✓	
Rhodamine Green	504	533	✓				✓	
JOE	520	548	✓			✓	✓	
HEX	533	559	✓			✓	✓	✓
Rhodamine B	543	565	✓				✓	
Cyanine 3	550	570		✓			✓	
TAMRA	560	582		✓		✓	✓	
ROX	587	607		✓		✓	✓	
Texas Red	595	613		✓			✓	
Cyanine 5	643	667		✓	✓	✓	✓	
Cyanine 5.5	675	694			✓			
DyLight 680	682	715			✓			
DyLight 755	752	778			✓			
DyLight 800	770	794			✓			

多通道检测相应的qPCR仪器与相关染料选择

Platform	FAM	HEX	JOE	ROX	TET	Cyanine 3	Cyanine 5	TAMRA	Texas Red
ABI 7900HT	✓		✓	✓	✓			✓	
ABI 7300	✓		✓	✓		✓		✓	
ABI 7500 / 7500 Fast	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓
ABI 7000	✓		✓	✓				✓	
ABI StepOne / ABI StepOnePlus	✓		✓	✓					
Agilent Mx4000/Mx3000P/Mx3005P	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Bio-Rad CFX96	✓	✓		✓			✓		✓
Bio-Rad iQ 5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Bio-Rad Opticon 2	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
Bio-Rad Chromo4	✓	✓	✓			✓		✓	
Bio-Rad MyiQ	✓								
Bio-Rad MiniOpticon	✓								
Takara TP700/TP800/TP900/TP950	✓	✓		✓			✓		✓
LightCycler 96	✓	✓		✓			✓		
LightCycler 480	✓	✓		✓			✓		

\* 仅列出了部分qPCR仪器和荧光染料，更详细情况请咨询仪器制造商。

## ■ 相关法规要求

样品种类	项目	国标要求	Takara标准
Primer	外观及性状	半透明或不透明的片状粉状物	半透明或不透明的片状粉状物
	引物探针的总量	相对误差 ≤ 10%	相对误差 ≤ 10%
	相对分子质量	相对误差 ≤ 0.05%	相对误差 ≤ 0.05% (500 ppm)
	碱基准确性	合成序列与订制序列100%匹配	合成序列与订制序列100%匹配
	纯度	脱盐级primer	HPLC纯度 ≥ 75%
OPC级primer		HPLC纯度 ≥ 85%	PAGE GC主带清晰 (HPLC纯度 ≥ 85% <sup>*1</sup> )
PAGE级primer		HPLC纯度 ≥ 90%	PAGE级单一主带 (HPLC纯度 ≥ 90% <sup>*1</sup> )
HPLC级primer		HPLC纯度 ≥ 95% (特殊序列 ≥ 90% <sup>*2</sup> )	HPLC纯度 ≥ 95% (特殊序列 ≥ 90% <sup>*2</sup> )
Probe	外观及性状	半透明或不透明的片状粉状物	半透明或不透明的片状粉状物
	引物探针的总量	相对误差 ≤ 10%	相对误差 ≤ 10%
	相对分子质量	相对误差 ≤ 0.05%	相对误差 ≤ 0.05% (500 ppm)
	碱基准确性	合成序列与订制序列100%匹配	合成序列与订制序列100%匹配
	修饰基团准确性	修饰基团与订制序列完全一致	修饰基团与订制序列完全一致
	纯度	HPLC纯度 ≥ 95% (特殊序列 ≥ 90% <sup>*2</sup> )	HPLC纯度 ≥ 95% (特殊序列 ≥ 90% <sup>*2</sup> )

\*1: Takara承诺标准, 但是合格证中不体现该项检测内容, 如需该项检测结果, 另外收取费用;

\*2: 特殊序列包括: 当碱基数 ≥ 41, 或引物有修饰, 或GC% ≥ 70%, 或序列中有连续5个G以上, 或RNA制品。

◆ **Oligo Data Sheet:** 随制品同时发送包含下述内容的数据表。ODS例:

### Oligo Data Sheet

---

Code: 5005 PO date: 2018/11/12

Mfg. ID	Name	Sequence(5'-3')	Size	MW	T <sub>m</sub> (°C)	ε (L/mol.cm)	%GC	nmols	μg	OD/pc
CIPF999-01	GAPDH F	5'-AGTTCGGTGTGAACGGATTG-3'	21	6557.3	64.4	209200	52	9.6	62.7	2.0
CIPF999-02	GAPDH R	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	23	7118.7	57.3	232900	43	8.6	61.1	2.0

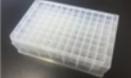
\*包含序列信息、GC含量、分子量、T<sub>m</sub>值、摩尔消光系数、nmols数以及OD/PC等数据, 方便客户使用。

Takara还致力于GMP生产, 为了满足客户的各种需求, 建立了相应质量标准进行生产, 还建立了可追溯体系, 可以验证质量以及规格。同时也提供大规模生产、纯化、终产品的分装和包装服务。

## ■ 包装订制、检测小样：

Takara为满足客户需求，对IVD客户可以提供各种订制包装形式的产品，例如tube、plate等，根据客户提供检测用小样（与大包装样品为相同lot分注的制品）：

- ★ 产品交付量：nmol级~克级
- ★ 指定浓度
- ★ 按要求分装
- ★ 可提供离心管、广口瓶、96孔板多种包装

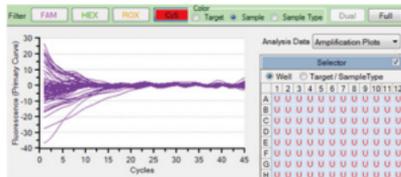
种类	试样	规格	种类	试样	规格
离心管 (避光)		1.5 ml	离心管 (15 ml)		15 ml 50 ml
离心管 (透明)		2.0 ml	广口瓶 (透明)		根据OD量确定 使用何种规格
离心管 (避光)		5.0 ml	离心管 (透明)		5.0 ml
Plate (96孔)		2.0 ml/孔	广口瓶 (避光)		根据OD量确定 使用何种规格

## ■ 防污染

防污染类型	能达到的标准
防外源模板污染	在洁净环境中进行产品的制造和分装，能够有效避免外源模板污染，达到200 NTC，0检出率
防交叉污染	进行严格的标准化操作，交叉污染率低于万分之一
防游离染料污染	痕量残留的染料不影响实验结果判定

### ☆ 防污染例

#### 1. 防外源模板污染：200 NTC无污染



#### 2. 防交叉污染：

标准：HPLC清洗引入交叉污染标准 $\leq 1\%$ ，Takara最高级别的防交叉污染，可达到下表的标准：

精制方法	交叉污染率
探针小量制备	<0.001%
引物小量制备	<0.0015%
探针大量制备	<0.05%
引物大量制备	<0.005%

## ■ 保存稳定性数据

对Oligo干品或溶液状态（TE或Milli-Q水溶解）制品，在不同保存温度、冻融状态和运输条件下的稳定性进行了验证，为客户保存提供了理论依据。

样品种类	稀释buffer	终浓度	保存温度	保存时间
Primer/probe	TE(10.0.1) pH8.0	10 $\mu$ M	-20 $^{\circ}$ C	24 months
	Milli-Q水	100 $\mu$ M	-20 $^{\circ}$ C	24 months
	干品	—	-20 $^{\circ}$ C	24 months

## ■ Oligo 定量说明

### 1、样品的稀释

1) 根据标签信息将样品稀释至100  $\mu$  M:

将干粉配制成100  $\mu$  M溶液，加入溶剂的体积为V  $V(\mu$ l)=nmol数  $\times$  10

2) 测定前，根据测量设备的要求，进一步稀释至合适浓度。

如采用NanoDrop 2000进行测定：建议将测定样品终浓度稀释至10  $\mu$  M

如采用UV法进行测定：建议将测定样品终浓度稀释至2  $\mu$  M

### 2、Primer & Probe测定

设备	Primer		Probe	
	UV法	NanoDrop	UV法	NanoDrop
模式	—	Nucleic Acid	—	Micro Array
Type	—	ssDNA	—	ssDNA
Dye/Chrom . Editor	—	—	—	添加修饰基团信息（见下表）
Dye1	—	—	—	选择标记的荧光基团

### ☆ 常见荧光基团的摩尔消光系数及吸收波长列表

荧光基团	Coeff.(l/mole-cm)/ 摩尔消光系数	Analysis Wavelength(nm)/ 吸收光波长
FAM	2.1E+4	494
HEX	3.2E+4	533
ROX	2.3E+4	587
ATTO488	1.3E+4	501
JOE	2E+4	520
TAMRA	2.9E+4	560
TEXAS RED	1.4E+4	595
TET	1.63E+4	521
BHQ1	8E+3	534
BHQ2	8E+3	579
BHQ3	8E+3	680

- 本宣传页上登载的制品，都是以科研为目的。请不要用于其它方面，如：不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经本公司许可，严禁产品的转售·转让、以转售·转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可信息请在本公司网站上确认：<http://www.takarabiomed.com.cn/>。
- 本宣传页上登载的公司名称及制品名称即使没有特殊标注，使用的也是各公司的商标或注册商标。
- 本宣传页仅限于中国大陆地区客户使用，其他地区客户请咨询当地代理商。
- 本宣传页上记载的产品信息是2019年9月1日的信息，最新信息请参考公司官网。

关注Takara微信和微博，  
好礼常常有！



Takara微信



Takara微博



Takara官网



Clontech Takara cellartis

销售商：

**宝日生物技术（北京）有限公司**  
Takara Biomedical Technology (Beijing) Co., Ltd.  
地址：北京市昌平区科学园路22号（中关村生命科学园内）  
电话：010-80720985, 80720986

制造商：

**宝生物工程（大连）有限公司**  
Takara Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.  
地址：辽宁省大连市经济技术开发区东北二街19号  
电话：0411-87621671

技术咨询热线：4006518761, 4006518769

技术咨询邮箱：[service@takarabiomed.com.cn](mailto:service@takarabiomed.com.cn)