

Code No. RR091A

研究用

TaKaRa

TB Green[®] Premix DimerEraser[™]
(Perfect Real Time)

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
● 保 存	2
● 试剂盒特长	2
● 使用前注意事项	2
● 操作方法	3
● 实验条件的选择	7
● 引物设计说明	9
● 关联产品	9

● 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。本制品通过添加辅助蛋白质和对 Buffer 组分的改良，使反应特异性比 TB Green *Premix Ex Taq*[™] II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B) 更高。特别对影响嵌合法的主要因素的二聚体的产生有明显抑制作用。本制品建议使用 3 Step PCR 作为标准流程，3 Step PCR 反应时间稍长，但能有效抑制非特异性的 PCR 扩增。

本制品对微量模板浓度也有很高的灵敏度，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。

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 7500/7500 Fast Real-Time PCR System, StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

LightCycler/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics)

Smart Cycler System/ Smart Cycler II System (Cepheid) etc.

● 试剂盒原理

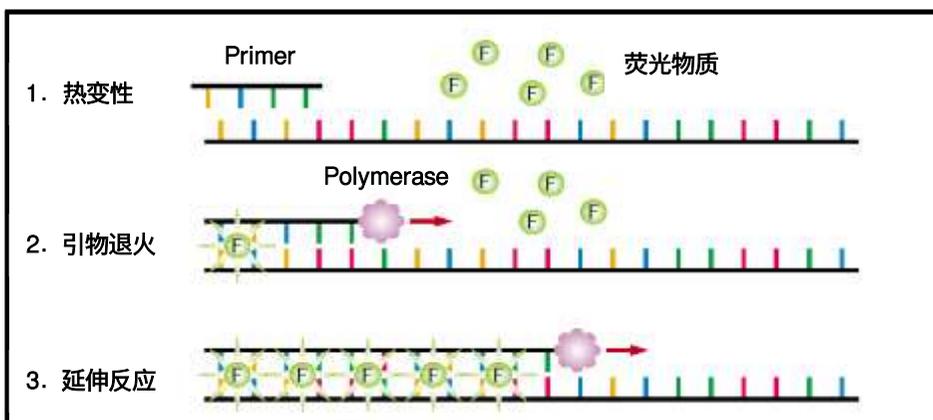
本制品使用了 *TaKaRa Ex Taq*[®] HS 进行 PCR 扩增，通过检测反应液中 TB Green 的荧光强度，达到监控 PCR 产物扩增量的目的。

1. PCR

PCR 法是以微量的 DNA 为模板，对目的基因进行特异性扩增的技术。由模板热变性、引物退火、DNA 聚合酶延伸反应构成一个循环，重复这个循环，可以在几个小时内把目的 DNA 扩增 100 万以上。本制品中的 DNA 聚合酶采用了比 *Taq* 酶扩增效率更高的 *TaKaRa Ex Taq* HS，可以在更短时间内进行高特异性和高灵敏度的检出，并能有效防止在热循环前由引物错配或引物二聚体产生的非特异性扩增。

2. 嵌合荧光检测法

荧光染料与双链 DNA 结合后发出荧光，所以可以通过检测反应体系中的荧光强度，达到检测 PCR 产物扩增量的目的，基于这一原理的检测方法即为嵌合荧光检测法。常用的荧光染料是 TB Green，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。其具体原理见下图。



● 制品内容 (50 μ l 反应 \times 200 次)

TB Green Premix DimerEraser (Perfect Real Time) (2X conc.) *1	1.0 ml \times 5 支
ROX Reference Dye (50X Conc.) *2	200 μ l \times 1 支
ROX Reference Dye II (50X Conc.) *2	200 μ l \times 1 支

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

*2 使用在 Applied Biosystems 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。

- ◆ 使用如下仪器时, 添加 ROX Reference Dye (50X):
 - StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- ◆ 使用如下仪器时, 添加 ROX Reference Dye II (50X):
 - Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System
 - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- ◆ 使用如下仪器时, 不需要添加 ROX Reference Dye:
 - Thermal Cycler Dice Real Time System 系列
(Code No. TP950/TP970/TP980/TP990, TP900/TP960/TP700/TP760: 终卖)
 - Smart Cycler System/Smart Cycler II System (Cepheid)
 - LightCycler/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics)

试剂盒外必备材料

1. Thermal Cycler for Real Time PCR
2. Real Time PCR 反应离心管或反应板
3. PCR 引物*
4. 灭菌水
5. 微量移液器和枪头 (高压灭菌)

*: 请参照引物设计说明来设计引物。

● 保 存: 4°C保存 6 个月。

避光保存, 避免污染。

注意: 长期保存请置于-80°C, 勿存于-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, 有效防止热循环反应前由引物非特异性退火引起的非特异性扩增。同时制品中还添加了辅助蛋白, 可以进一步抑制 PCR 反应中由于引物的非特异性退火或引物二聚体等引起的非特异性扩增。

● 使用前注意事项

以下为使用本试剂盒时的注意事项, 使用前请一定认真阅读。

1. 使用时请上下颠倒轻轻均匀混合, 避免产生气泡, 防止因混合不均匀造成的反应不足。
 - a) 请勿涡旋振荡混匀。
 - b) TB Green Premix DimerEraser (2X conc.)在-80°C存放可能会产生白色或淡黄色的沉淀, 可用手掌温度缓慢融解于室温避光放置, 轻柔的上下颠倒混匀直至沉淀全部消失。
 - c) 沉淀会导致溶液成分不均一, 使用前务必充分混匀试剂。
2. 请于冰上配制反应试剂。
3. 本制品中含有荧光染料 TB Green, 保存制品或配制 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

TB Green Premix DimerEraser (Perfect Real Time) 的标准流程是3 Step PCR法。

◆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）。

试剂	使用量	终浓度
TB Green Premix DimerEraser (2X)	12.5 μ l	1X
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.75 μ l	0.3 μ M ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.75 μ l	0.3 μ M ^{*1}
Template (<100 ng) *2	2 μ l	
灭菌水	9 μ l	
Total	25 μ l	

*1 通常引物终浓度为 0.3 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 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。如果欲使用本产品进行 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3-step PCR法反应程序。使用Thermal Cycler Dice Real Time System III 时，设定为“Normal Mode”程序（default），使用Thermal Cycler Dice Real Time System II and Lite（终卖）时，设定为“Fast Mode”程序（default）。反应性能有问题时，可以进行反应条件摸索或者试试两步法。



3-step PCR 标准流程

Hold（初期变性）

Cycle: 1

95°C 30 秒

3-step PCR

Cycle: 40

95°C 5 秒

55°C 30 秒

72°C 30 秒

Dissociation

◆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 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。

◆应用 Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR 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	使用量	终浓度
TB Green Premix DimerEraser (2X)	10 μ l	25 μ l	1X
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.6 μ l	1.5 μ l	0.3 μ M ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.6 μ l	1.5 μ l	0.3 μ M ^{*1}
ROX Reference Dye (50X) or Dye II (50X) ^{*3}	0.4 μ l	1 μ l	1X
Template ^{*2}	2 μ l	4 μ l	
灭菌水	6.4 μ l	17 μ l	
Total	20 μ l ^{*4}	50 μ l ^{*4}	

- *1 通常引物终浓度为 0.3 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 20 μ l 反应体系 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。如果欲使用本产品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。
- *3 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。ROX Reference Dye II (50X) 比 ROX Reference Dye (50X) 浓度低，Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System 使用 ROX Reference Dye II (50X)；StepOnePlus 使用 ROX Reference Dye (50X)。
- *4 按不同型号仪器的推荐体系配制反应液。

2. 进行 Real Time PCR 反应。

建议采用下列图表显示的3-step PCR反应程序，如果该程序得不到良好的实验结果时，可以进行反应条件摸索或者试试两步法。

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

3-step PCR 标准流程:

Stage 1: 预变性

Reps: 1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Reps: 40

95°C 5 秒

55°C 30 秒

72°C 30 秒或 34 秒*

Stage 3: Melt Curve

* StepOnePlus 设定 30 秒、7500 设定 34 秒。

<Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System>

3-step PCR 标准流程:

Holding Stage

Number of Cycles: 1

95°C 30 秒

Cycling Stage

Number of Cycles: 40

95°C 3 秒

55°C 30 秒

72°C 30 秒

Melt Curve Stage

◆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/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics) 扩增仪的操作方法

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
TB Green Premix DimerEraser (2X)	10 μ l	1X
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.6 μ l	0.3 μ M ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.6 μ l	0.3 μ M ^{*1}
Template (<100 ng) *2	2 μ l	
灭菌水	6.8 μ l	
Total	20 μ l	

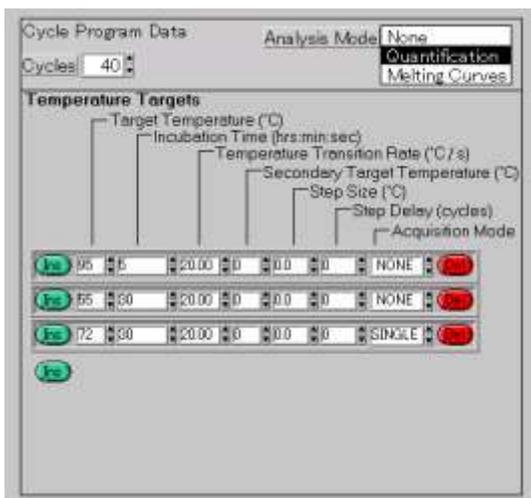
*1 通常引物终浓度为 0.3 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在 0.2~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

*2 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 3-step PCR 反应程序, 如果该程序得不到良好的实验结果时, 可以进行反应条件摸索或者试试两步法。

< LightCycler >



3-step PCR 标准流程:

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

55°C 30 秒 20°C/秒

72°C 30 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 >

3-step PCR Standard Protocol

Denature

95°C 30 sec (Ramp Rate 4.4°C/sec)

1 Cycle

PCR

Analysis Mode: Quantification

95°C 5 sec (Ramp Rate 4.4°C/sec)

55°C 30 sec (Ramp Rate 2.2°C/sec)

72°C 30 sec (Ramp Rate 4.4°C/sec, Acquisition Mode: Single)

40 Cycles

Melting

Analysis Mode: Melting Curves

95°C 5 sec (Ramp Rate 4.4°C/sec)

60°C 1 min (Ramp Rate 2.2°C/sec)

95°C (Ramp Rate 0.11°C/sec, Acquisition Mode : Continuous, Acquisitions : 5 per°C)

1 Cycle

Cooling

50°C 30 sec (Ramp Rate 2.2°C/sec)

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. 实验结果分析。

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。分析方法参见仪器使用手册。

◆应用 Smart Cycler 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
TB Green Premix DimerEraser (2X)	12.5 μ l	1X
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.75 μ l	0.3 μ M ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.75 μ l	0.3 μ M ^{*1}
Template (<100 ng)	2 μ l	^{*2}
灭菌水	9 μ l	
Total	25 μ l	

*1 通常引物终浓度为 0.3 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 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 反应液作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2. PCR 反应管请用离心机轻轻离心后放入 Smart Cyclor II System 中进行 Real Time PCR 反应。
建议采用下列图表显示的 3-step PCR 反应程序，如果该程序得不到良好的实验结果时，可以进行反应条件摸索或者试试两步法。

Stage 1			Stage 2				Stage 3			
Hold			Repeat 40 times.				Melt Curve			
Temp	Secs	Optics	3-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	55.0	30	Off				
			NA	72.0	30	On				
			<input type="checkbox"/> Advance to Next Stage							

3-step PCR标准流程:

Stage 1: 预变性

Hold

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Repeat: 40 times

95°C 5 秒

55°C 30 秒

72°C 30 秒

Stage 3: Melt Curve analysis

◆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。分析方法参见仪器操作手册。

● 实验条件的选择

如果按照推荐的三步法条件进行反应，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 系列试剂(Code No. RR820A/B, RR420Q/A/B, RR430A/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，并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：

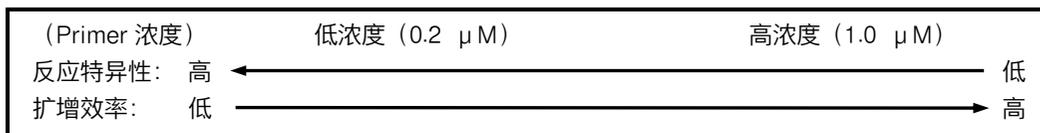
- No Template Control 时不产生引物二聚体等非特异性扩增。
- 不产生目的片段以外的扩增。

○ 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%)。

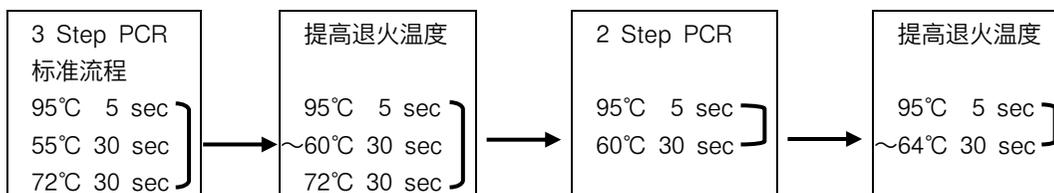
1. Primer 浓度与反应性能间的关系如下：

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：

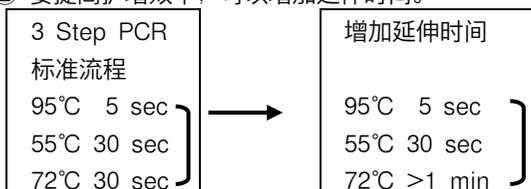


2. PCR 条件与反应性能间的关系如下:

① 要提高反应特异性或两步法 PCR，可以提高退火温度。



② 要提高扩增效率，可以增加延伸时间。

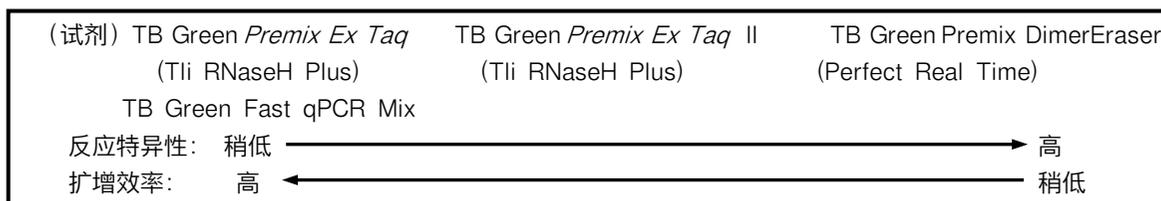


③ 预变性。

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. RR420Q/A/B) 和TB Green Fast qPCR Mix (Code No. RR430A/B)是扩增效率与反应特异性综合性较好、通用性高的试剂，但是，如果想提高反应特异性，使用TB Green Premix DimerEraser™(Perfect Real Time) (Code No. RR091A/B) 和TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR820Q/A/B)则更有效。



● 引物设计说明

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°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' 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, Inc.)

*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。

本公司以美国 NCBI Data Base 上登录的 Human、Mouse、Rat、Cow、Dog、Chicken 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！

● 关联产品

TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420Q/A/B)

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

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

Probe qPCR Mix (Code No. RR391A/B)

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

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

Thermal Cycler Dice, DimerEraser, *Premix Ex Taq*, 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>