

Code No. RR430S
RR430A

研究用

TAKARA

TB Green[®] Fast qPCR Mix

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	2
● 特 长	2
● 使用注意	3
● 操作方法	3
● 实验条件的选择方法	9
● 附 录	10
● 关联产品	12

● 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。制品中适用于快速 PCR 反应的突变型 *Taq* DNA 聚合酶与适合抗 *Taq* 抗体的反应液组合使用，可降低引物二聚体出现频率，实现快速 PCR 反应和在宽广的动态定量区域内对靶基因进行准确定量、检测，重复性好。此外，2X Premix 试剂中，已预先添加了 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。通过对酶和 PCR 反应液组分改良后，可适用于稍长片段的靶基因和高 GC 含量的靶基因，对 PCR 阻害物也有很强的抵抗性。本制品是 2X 浓度的 Premix 型试剂，预先混有适合实时监测浓度的 TB Green，配制 PCR 反应液十分简便。

本制品适用的PCR仪

- Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
- Thermal Cycler Dice Real Time System II (Code No. TP900/TP960: 终卖)
- Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (Code No. TP700/TP760: 终卖)
- Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System、7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- LightCycler 96/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

本制品使用突变型 *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

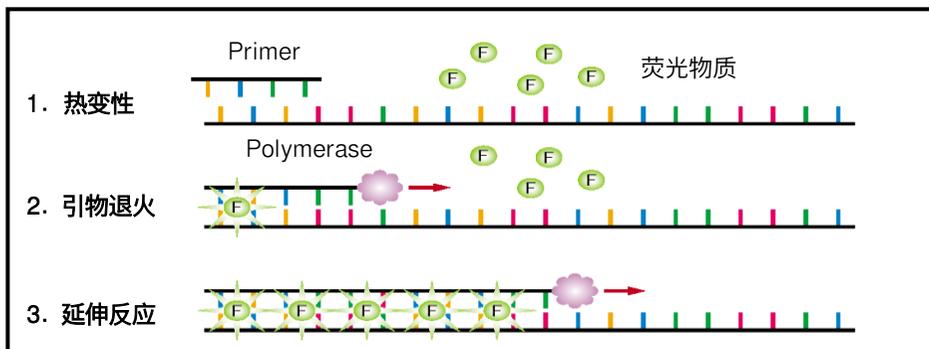
PCR 法是以微量 DNA 进行目的片段扩增的方法。通过 DNA 链的热变性、引物退火、DNA 聚合酶作用下引物的延伸三个步骤循环往复，可在短时间内扩增 DNA 达 100 万倍以上。

本制品在 PCR 扩增中，由于使用了 Hot Start PCR 用突变型 *Taq* DNA 聚合酶，能够抑制在调制反应液等低温条件下由引物错配或引物二聚体产生的非特异性扩增，可以进行高灵敏度的检出。

2. 荧光检出 (嵌合荧光检测法)

TB Green 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 TB Green 荧光强度，达到检测 PCR 产物扩增量的目的。

具体原理见下图。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，不仅可以对目的基因进行定量，同时还可以测定扩增的目的 DNA 片段的融解温度。



● 制品内容 (RR430S: 50 μl 反应×40 次、RR430A: 50 μl 反应×200 次)

	Code No. RR430S	RR430A
TB Green Fast qPCR Mix (2X conc.) *1	1 ml	1 ml×5
ROX Reference Dye (50X conc.) *2	40 μl	200 μl
ROX Reference Dye II (50X conc.) *2	40 μl	200 μl

*1: 内含改良突变型 *Taq* HS, dNTP Mixture, Mg²⁺, Tli RNaseH 和 TB Green。

*2: 使用在 Applied Biosystems 的 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
 - Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
 - StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- ◆ 使用 ROX Reference Dye II (50X) 的 PCR 仪
 - Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- ◆ 不需要使用 ROX 的 PCR 仪
 - Thermal Cycler Dice Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
 - Thermal Cycler Dice Real Time System II (Code No. TP900/TP960: 终卖)
 - Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760: 终卖)
 - LightCycler 96/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

1. Real Time PCR 扩增仪 (authorized instruments)
2. 实验专用反应管或反应板
3. PCR 引物*
4. 灭菌水
5. 微量移液器和枪头 (已高压灭菌)

*: 引物设计请参考“附录”。

● 保存:

4℃保存: 6 个月性能稳定。

避光保存, 避免污染。

长期保存请于-20℃保存。一旦开始使用请于 4℃保存并在 6 个月之内使用完。

● 特 长:

1. 通过 Real Time PCR 反应, 可以快速、准确地对目的基因进行检测、定量。
2. 本制品是预先混有 TB Green 的 2X 浓度的 Premix 试剂, 只需加入引物、模板、灭菌水便可通过嵌合荧光检测法进行 Real Time PCR 反应。
3. PCR 反应使用的是可进行快速 PCR 反应的突变型 *Taq* HS。由于优化的反应 Buffer 适用于 Real Time PCR, 因此扩增效率高, 可以进行高灵敏度的检出。
4. 在 2X Premix 试剂中, 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。
5. 酶和 PCR 反应液组分通过改良后, 提高了对 PCR 阻害物的抵抗性。

● 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. 进行 Real Time RT-PCR 反应时，反转录反应所用的试剂推荐使用：
PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037Q/A/B)
PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036Q/A/B)
以上制品与本制品组合使用可以得到可信用度高的结果。
本制品与 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code No. RR047Q/A/B) 组合使用时，有时反应性能不好，不推荐使用。
2. 使用前，请上下轻轻颠倒混匀，避免产生气泡，试剂混匀后再使用。试剂混合不均匀会造成反应效果不佳。
 - (1) 请勿涡旋振荡混匀。
 - (2) TB Green Fast qPCR Mix (2X)在-20℃保存时，可能会产生白色或淡黄色的沉淀。可用手握缓慢溶解，或于室温短时间避光放置后，上下颠倒混匀直至沉淀全部消失。
 - (3) 沉淀会导致试剂组分不均匀，必须混匀后再使用。
3. 配制反应液时，试剂请于冰上放置。
4. 本制品中含有荧光染料 TB Green，配制 PCR 反应液时应避免强光照射。
5. 反应液的配制、分装请一定使用新的一次性枪头、尽量避免样品间的污染。

● 操作方法

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

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

1. 按下列组分配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

<1 反应体系>

试剂	使用量	终浓度
TB Green Fast qPCR Mix (2X)	12.5 μ l	1X
PCR Forward Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M*1
PCR Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M*1
DNA 模板 (<100 ng) *2	2 μ l	
灭菌水	8.5 μ l	
Total	25 μ l*3	

*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: 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%。

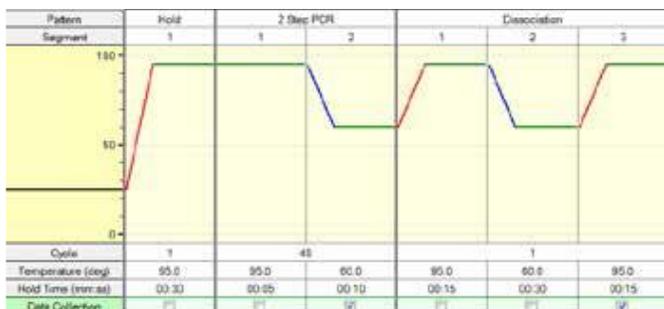
*3: 建议反应液量为 25 μ l。

2. 开始 Real Time PCR 反应。

建议采用下面的 Shuttle PCR 标准操作流程进行 PCR 反应。

首先尝试使用下面的操作流程，必要时进行 PCR 反应条件的优化。使用 Tm 值较低的引物等进行 Shuttle PCR 难以扩增时，进行三步法 PCR 扩增反应。

Shuttle PCR 扩增标准操作流程：



Hold : 预变性
 Cycle: 1
 95°C 30 秒
 2 step PCR*4
 Cycle: 40
 95°C 5 秒
 60°C 10 秒
 Dissociation

* 4: 优化 PCR 反应条件请参照「实验条件的选择方法」。

※使用注意:

本制品中使用的突变型 *Taq* HS 是利用抗 *Taq* 抗体抑制 DNA 聚合酶活性的 Hot Start PCR 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。

- 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。
分析方法参见 Thermal Cycler Dice Real Time System 的使用说明书。

【使用 Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR System 时的操作方法】

注意: 请按照各仪器的使用说明书进行操作。

- 按下列组分配制 PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

<1 反应体系>

试剂	使用量	使用量	终浓度
TB Green Fast qPCR Mix (2X)	10 μl	25 μl	1X
PCR Forward Primer (10 μM)	0.8 μl	2 μl	0.4 μM*1
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8 μl	2 μl	0.4 μM*1
ROX Reference Dye (50X) or Dye II (50X) *2	0.4 μl	1 μl	1X
DNA 模板*3	2 μl	4 μl	
灭菌水	6 μl	16 μl	
Total	20 μl*4	50 μl*4	

*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: ROX Reference Dye II (50X) 比 ROX Reference Dye (50X) 浓度低, 使用 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 和 7500 Fast Real-Time PCR System 时, 请使用 ROX Reference Dye II (50X)。

使用 StepOnePlus 和 7300 Real-Time PCR System 时, 请使用 ROX Reference Dye (50X)。

*3: 模板添加量因模板溶液中存在的靶基因的拷贝数不同而不同, 进行梯度稀释研讨适当的模板添加量。在 20 μl 反应体系中模板 DNA 添加量最好在 100 ng 以下。以 RT-PCR 反应的 cDNA (RT 反应液) 为模板时, 添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

*4: 按照各仪器推荐体系进行反应液配制。

2. 开始 Real Time PCR 反应。

建议采用下面的 Shuttle PCR 标准操作流程进行 PCR 反应。

首先尝试使用下面的操作流程，必要时进行 PCR 反应条件的优化。使用 T_m 值较低的引物等进行 Shuttle PCR 难以扩增时，进行三步法 PCR 扩增反应。优化 PCR 反应条件请参照「实验条件的选择方法」。

<Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System、StepOnePlus>

Shuttle PCR 扩增标准操作流程：

Stage 1: 预变性

Reps: 1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Reps: 40

95°C 5 秒

60°C 10~15 秒*1

Stage 3: Melt Curve

*1: 选择所使用的荧光通道 (FAM、ROX)，通过选择的荧光通道可以设定最短的检测时间。
StepOnePlus 可以设定为 10 秒。

<Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System>

Shuttle PCR 扩增标准操作流程：

Holding Stage

Reps: 1

95°C 30 秒

Cycling Stage

Number of Cycles: 40

95°C 3 秒

60°C 12 秒~15 秒*2

Melt Curve Stage

*2: 选择所使用的荧光通道 (FAM、ROX)，通过选择的荧光通道可以设定最短的检测时间。

※使用注意：

本制品中使用的突变型 *Taq* HS 是利用抗 *Taq* 抗体抑制 DNA 聚合酶活性的 Hot Start PCR 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. 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。
分析方法参见 Real Time PCR 仪的使用说明书。

【使用 LightCycler 96/LightCycler 480 System 时的操作方法】

注意：请按照 Roche Diagnostics 各仪器的使用说明书进行操作。

1. 按下列组分配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

<1 反应体系>

试剂	使用量	终浓度
TB Green Fast qPCR Mix (2X)	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: 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. 开始 Real Time PCR 反应。

建议采用下面的 Shuttle PCR 标准操作流程进行 PCR 反应。

首先尝试使用下面的操作流程, 必要时进行 PCR 反应条件的优化。使用 T_m 值较低的引物等进行 Shuttle PCR 难以扩增时, 进行三步法 PCR 扩增反应。优化 PCR 反应条件请参照「实验条件的选择方法」。

<LightCycler 96>

Shuttle PCR 扩增标准操作流程:

Stage 1: 预变性

94°C 30 秒 20°C/秒

1 Cycle

Stage 2: PCR 反应

94°C 5 秒 20°C/秒

60°C 10 秒 20°C/秒

40 Cycles

Stage 3: 融解曲线分析

95°C 0 秒 20°C/秒

60°C 15 秒 20°C/秒

95°C 0 秒 0.1°C/秒

<LightCycler 480 System>

Shuttle PCR 扩增标准操作流程:

变性

94°C 30 秒 (Ramp Rate 4.8°C/sec.)

1 cycle

PCR

Analysis Mode: Quantificatio

94°C 5 秒 (Ramp Rate 4.8°C/sec.)

60°C 10 秒 (Ramp Rate 2.5°C/sec.、Acquisition Mode : Single)

40 cycles

融解

Analysis Mode: Melting Curves

95°C 5 秒 (Ramp Rate 4.8°C/sec.)

60°C 1 分 (Ramp Rate 2.5°C)

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

1 cycle

降温

50°C 30 秒 (Ramp Rate 2.5°C/sec.)

1 cycle

※使用注意:

本制品中使用的突变型 *Taq* HS 是利用抗 *Taq* 抗体抑制 DNA 聚合酶活性的 Hot Start PCR 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. 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。
分析方法参见各 PCR 仪的使用说明书。

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

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

1. 按下列组分配制 PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

<1 反应体系>

试剂	使用量	终浓度
TB Green Fast qPCR Mix (2X)	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: 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. 开始 Real Time PCR 反应。

建议采用下面的 Shuttle PCR 标准操作流程进行 PCR 反应。

首先尝试使用下面的操作流程, 必要时进行 PCR 反应条件的优化。使用 T_m 值较低的引物等进行 Shuttle PCR 难以扩增时, 进行三步法 PCR 扩增反应。优化 PCR 反应条件请参照「实验条件的选择方法」。

Shuttle PCR 扩增标准操作流程:

Sample Volume : 20 μ l

Step 1: 95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

GOTO: 39 (40 Cycle)

95°C 5秒

60°C 10秒*

Stage 3: Melt Curve

※使用注意:

本制品中使用的突变型 *Taq* HS 是利用抗 *Taq* 抗体抑制 DNA 聚合酶活性的 Hot Start PCR 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. 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。
分析方法参见 CFX96 Real Time PCR Detection System 的使用说明书。

【使用 Smart Cycler II System 时的操作方法】

注意: 请按照 Smart Cycler II System 使用说明书进行操作。

1. 按下列组分配制 PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

<1 反应体系>

试剂	使用量	终浓度
TB Green Fast qPCR Mix (2X)	12.5 μ l	1X
PCR Forward Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M*1
PCR Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ M*1
DNA 模板 (<100 ng) *2	2 μ l	
灭菌水	8.5 μ l	
Total	25 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: 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. PCR 反应管用 Smart Cycler 专用离心机轻轻离心后, 放入到 Smart Cycler 中进行 Real Time PCR 反应。

建议采用下面的 Shuttle PCR 标准操作流程进行 PCR 反应。

首先尝试使用下面的操作流程, 必要时进行 PCR 反应条件的优化。使用 T_m 值较低的引物等进行 Shuttle PCR 难以扩增时, 进行三步法 PCR 扩增反应。优化 PCR 反应条件请参照「实验条件的选择方法」。

Shuttle PCR 扩增标准操作流程:

Stage 1: 预变性

Hold

95°C 30秒

Stage 2: PCR 反应

Repeat: 40 times

95°C 5秒

60°C 10秒

Stage 3: Melt Curve

※使用注意:

本制品中使用的突变型 *Taq* HS 是利用抗 *Taq* 抗体抑制 DNA 聚合酶活性的 Hot Start PCR 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. 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。
分析方法参见 Smart Cycler System 的使用说明书。

● 实验条件的选择方法

如果按照推荐条件 (Shuttle PCR 标准操作流程) 进行反应, 反应性能不好时, 请按照下面的方法进行引物浓度和 PCR 反应条件的研讨。

选择实验条件时, 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准确定量。

- 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。
- 不产生目的扩增产物以外的非特异性扩增。

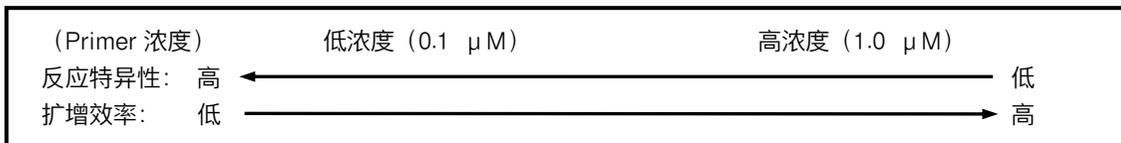
- 扩增效率高的实验体系应具备以下条件:

- 扩增产物起峰更早 (Ct 值小)。
- PCR 扩增效率高 (接近理论值 100%)。

【引物浓度的研讨】

引物浓度与反应特异性及扩增效率间的关系如下:

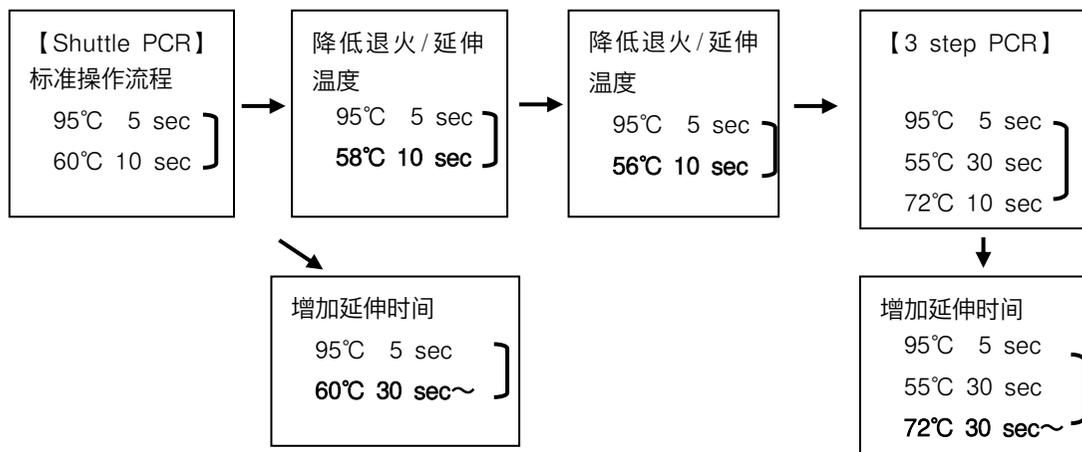
要提高反应特异性时降低引物浓度; 要提高扩增效率时提高引物浓度。图示如下:



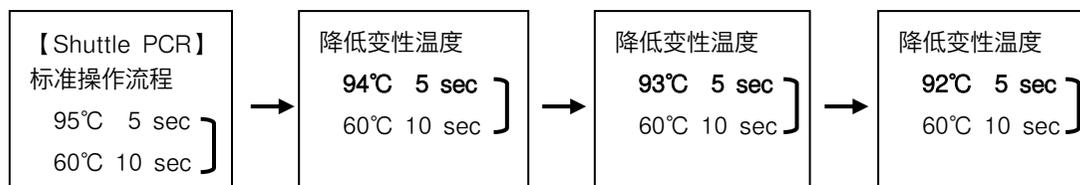
【PCR 反应条件的研讨】

- 要提高扩增效率时

- (1) 通过降低退火/延伸温度或变更为 3 Step PCR、或通过增加延伸时间可改善扩增效率。请按照以下顺序进行研讨。

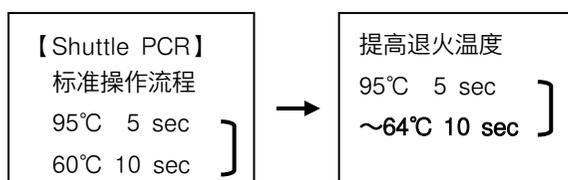


(2) 通过从 95°C 至 92°C 每间隔 1°C 降低变性温度可改善扩增效率。



○ 要提高反应特异性时

提高退火温度可改善反应特异性。同时确认扩增效率，在满足这两个条件下进行研讨。



○ 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 模板基本上都能够很好的变性。根据模板状态，可以延长至 95°C、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。

● 附录

1. 引物设计

为了有效进行 Real Time PCR 反应，设计反应性能良好的 PCR 引物非常重要。请根据以下原则，设计 PCR 扩增效率高、无非特异性扩增反应的引物。

■ 扩增产物

扩增产物长度	80~150 bp 较为合适（可以扩增至 300 bp）
--------	------------------------------

■ 引物

引物长度	17~25 mer
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	3' 端避免 GC rich 或 AT rich。 3' 端碱基最好为 G 或 C。 3' 端尽量避免碱基为 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，恕不受理不在本公司合成的引物/探针的设计委托!

2. 进行 Real Time RT-PCR 反应时

进行 Real Time RT-PCR 反应时，反转录反应所用的试剂推荐使用：

- PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037Q/A/B)
- PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036Q/A/B)

以上制品与本制品组合使用可以得到可信用度高的结果。

本制品与 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code No. RR047Q/A/B) 组合使用时，有时反应性能不好，不推荐使用。

(1) 按下列组分配制 PCR 反应液（反应液请在冰上配制）。

(使用 Thermal Cycler Dice Real Time System 时)

将以下组分配制成所需管数+α，取 22.5~24 μl 分装于反应管中。

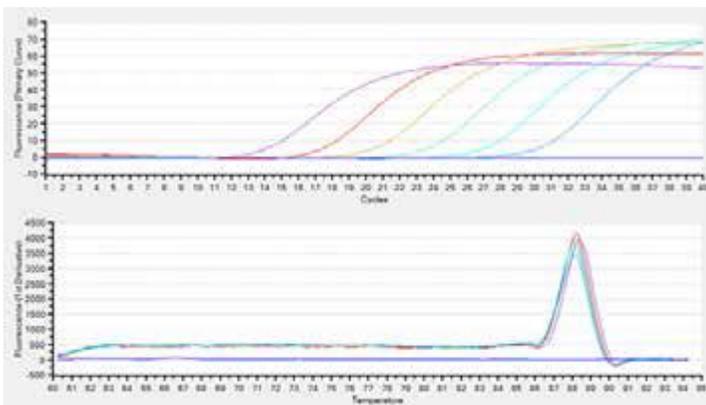
<1 反应体系>

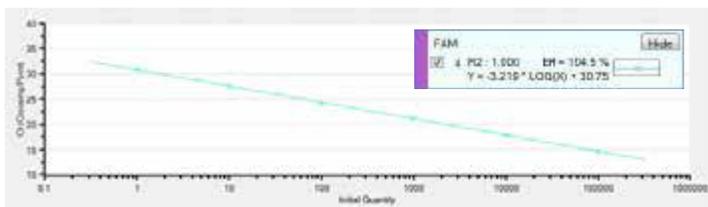
试剂	使用量	终浓度
TB Green Fast qPCR Mix (2X)	12.5 μl	1X
PCR Forward Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	1 μl	0.4 μM
灭菌水	X μl	
Total	22.5-24 μl	

(2) 在分装了上述 PCR 反应液的反应管中加入 1~2.5 μl 反转录反应液。

注：PCR 反应中的反转录反应液添加量不要超过 2.5 μl。

■ 反应例





通过 Real Time RT-PCR 对 Human ACTB mRNA 进行了检测。以相当于 1 pg~100 ng Total RNA 量的 cDNA 作为模板，以灭菌水作为 Negative Control 的模板。

● 关联产品

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

TB Green[®] *Premix DimerEraser*[™] (Perfect Real Time) (Code No. RR091Q/A/B)

TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] GC (Perfect Real Time) (Code No. RR071Q/A/B)

PrimeScript[™] RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR037Q/A/B)

PrimeScript[™] RT Master Mix (Perfect Real Time) (Code No. RR036Q/A/B)

One Step TB Green[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Code No. RR066A/B)

One Step TB Green[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (Code No. RR086A/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)

TB Green is a registered trademark of Takara Bio Inc.

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