

Code No. RR651A

研究用

TAKARA

PrimeDirect[®] Probe
RT-qPCR Mix, with UNG

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	3
● 特 长	3
● 操作注意	3
● 操作方法	3
● 附录：RNA 样品的制备	5
● 关联产品	6

● 制品说明

PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG是采用探针法(5' nuclease法)进行One Step Real Time RT-PCR的专用试剂盒。本制品是2X premix型,使用时只需要加入检测目的基因所需的引物、探针及模板样品,即可快速开始反应。样品数量较多时,本制品可以直接以含有RNA病毒等的生物样品起始反应,无需进行RNA提取及纯化。由于核酸提取、反转录、qPCR各反应在同一反应管中连续进行,大大提高了操作简便性,减少了反应时间。从核酸提取(90℃)到反转录反应(55-65℃)连续进行,对于含有复杂高级结构的RNA病毒等的检测也能发挥作用。cDNA合成后进行高扩增效率的PCR反应,探针发出的荧光可实时检出。对于重复检测特定目的基因等的实验,实验环境中常混有先前检测反应的扩增产物,本制品中含有能够分解带有dUTP的PCR产物的UNG(Uracil N-Glycosylase),持续使用本制品能够有效避免交叉污染造成的假阳性问题。

本制品对于肝素(血液)和腐殖酸(土壤)等各种有害物质具有高耐受性,可用于从各种生物样品直接起始进行病毒及细菌检测,或基因的表达分析等应用。

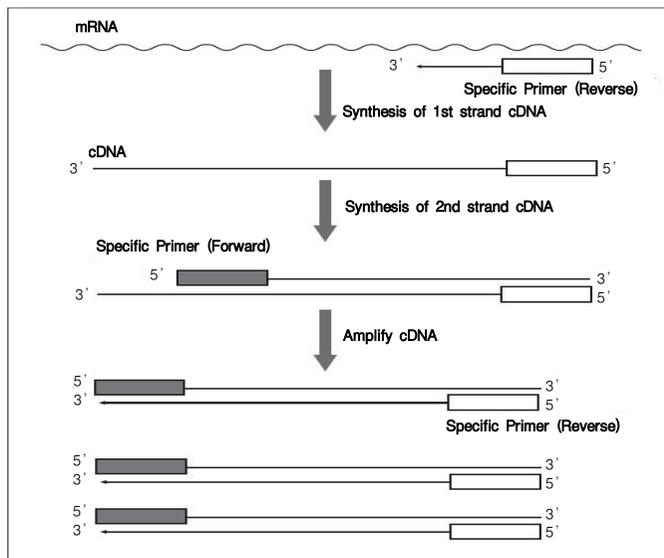
● 试剂盒原理

PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG可在单个反应管中以生物样品起始,连续进行从核酸提取、反转录反应到cDNA合成和PCR扩增的反应。通过实时检测探针的荧光信号强度,以监测PCR产物扩增量。

1. RT-PCR

RNA虽不能直接作为PCR的模板,但是通过使用反转录酶将RNA合成cDNA,就可以利用PCR对RNA进行分析。这就是RT-PCR,是高灵敏度的RNA检测方法。本制品使用One Step RT-PCR法,其原理如下图所示。

One Step RT-PCR先使用PCR用特异性引物(Reverse)进行反转录反应,然后以合成的cDNA为模板,经特异性引物(Forward, Reverse)进行PCR扩增,整个反应在同一个反应管中连续进行。

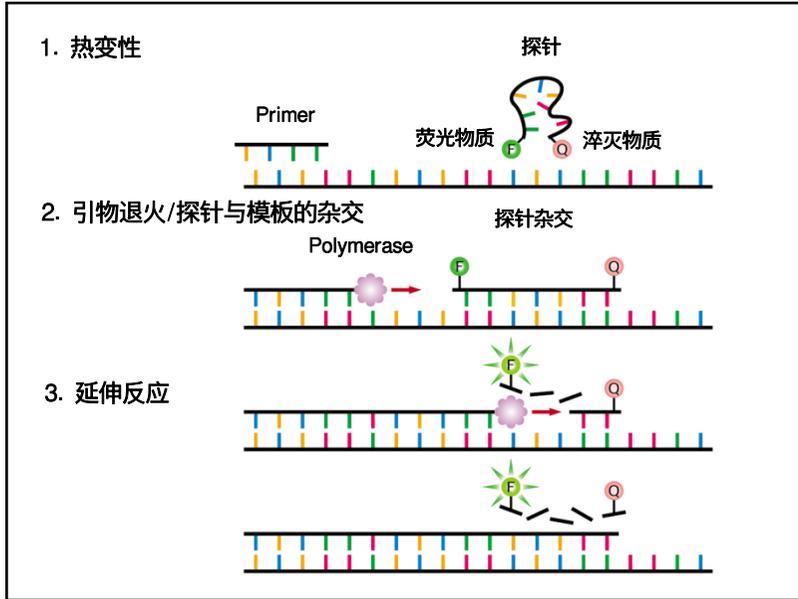


One Step RT-PCR 原理

2. 荧光检出

本制品使用了在寡核苷酸5'端带有荧光物质(如:FAM等),同时3'端带有淬灭物质(如:TAMRA, BHQ1等)修饰的检出探针。退火条件下,探针与模板DNA特异性杂交,但是5'端的荧光物质受到3'端淬灭物质的制约,不能发出荧光。在PCR反应的延伸过程中,DNA聚合酶的5'→3' Exonuclease活性可以分解与模板杂交的荧光探针,从而解除淬灭物质的制约,游离的荧光物质发出荧光。该过程中产生

的荧光可以通过 Real Time PCR 装置检出。这些原理组合形成的方法，可以对样品进行实时定量，被称为 One Step RT-q (quantitative) PCR。



● 制品内容 (25 μ l 反应 \times 200 次)

1. PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG (2X)	625 μ l \times 4
2. RNase Free H ₂ O	1.25 ml \times 2
3. ROX Reference Dye (50X) *	100 μ l
4. ROX Reference Dye II (50X) *	100 μ l

*: 使用 Applied Biosystems 的 Real Time PCR 仪等, 需要进行孔间荧光信号校正时, 添加量为终浓度 0.5X。

试剂盒外必备材料

- Real Time PCR 扩增仪
本制品适用机型
Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
Thermal Cycler Dice Real Time System (Code No. TP800/TP860: discontinued)
Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (Code No. TP700/TP760: discontinued)
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
LightCycler 96 System (Roche Diagnostics)
LightCycler 480 System (Roche Diagnostics)
CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- 专用的反应管或反应板
- PCR 引物
- 检测用探针 (Takara qPCR Probe 等)
- 微量移液器和枪头 (无菌, 带有滤膜)

● 保存: -20℃

● 特长

1. Probe 法检测用 2X One Step RT-qPCR 试剂
2. 反应液中直接进行生物样品核酸的热提取
3. 高温下 (55~65℃) 进行反转录反应
4. 阻害物质耐受性高

● 操作注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项, 使用前请认真阅读。

- 1) PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG (2X) 室温融解后, 轻轻混匀, 并轻微离心将液体收集于管底。使用后, 立即于-20℃保存。
- 2) 分取试剂时请务必使用新的一次性枪头, 以避免样品间的污染。
- 3) 当同时需要进行多个 Real Time One Step RT-PCR 反应时, 将反应液配成必要量+α的混合液 (PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix ,with UNG (2X), RNase Free H₂O, Primer · Probe 或样品的混合液)。这样分取的试剂体积更准确, 可以减少试剂损失, 避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作或实验样品之间产生的误差。
- 4) 本制品只能使用特异性反转录引物, 不能使用 Random Primer 和 Oligo dT Primer 进行反转录反应。

● 操作方法

注意: 请按照各机型的说明书进行操作。

- 1) 反应液的制备

室温下配制下述反应液。

【无需添加 ROX Reference Dye 的仪器】*6

试剂	使用量	终浓度
PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG (2X)*1	12.5 μl	1X
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM*2
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM*2
Probe (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM*3
样品	≤2.5 μl*4	
RNase Free H ₂ O	X μl	
Total	25 μl*5	

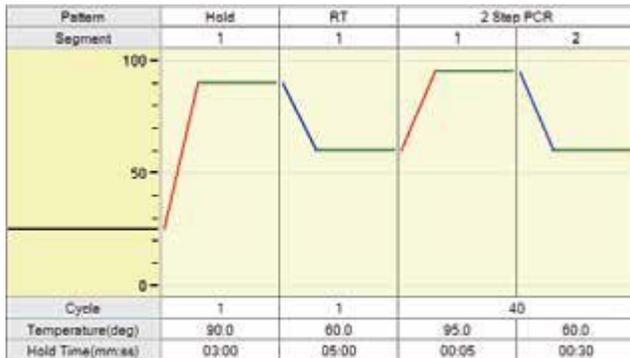
【需要添加 ROX Reference Dye 的仪器】*6

试剂	使用量	终浓度
PrimeDirect Probe RT-qPCR Mix, with UNG (2X)*1	12.5 μl	1X
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM*2
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM*2
Probe (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM*3
ROX Reference Dye or Dye II (50X) *6	0.25 μl	0.5X
样品	≤2.5 μl*4	
RNase Free H ₂ O	X μl	
Total	25 μl*5	

2) Real Time RT-qPCR 反应

PCR 反应管或反应板轻微离心后，放入 Real Time PCR 仪器中，按照下述条件开始反应。

反应推荐按照下述的标准操作流程进行。首先，尝试该操作流程，然后根据需要优化 PCR 反应条件（请参照「RT-qPCR 反应条件说明」）。



Pattern 1: 反转录反应

(37°C 10 分钟)^{*7}

90°C 3 min (含有病毒等的生物样品) 或 95°C 30 sec (粗提样品·纯化核酸)^{*8}

60°C 5 min

Pattern 2: PCR 反应

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 30 sec^{*9}

3) 反应结束后确认扩增曲线，进行定量时制作标准曲线等。

分析方法参见仪器的操作手册。

* 1~9: 请参考「RT-qPCR 反应条件说明」。

4) RT-qPCR 反应条件说明

请首先按照说明书提供的标准操作方法进行实验。

核酸热提取·变性

Step	温度	时间	检出	说明
变性 (粗提·核酸纯化)	95-98°C	30 秒	OFF	根据仪器及目的基因不同，适宜的变性温度不同。 95°C 反应效果差时，请在 96-98°C 的范围内研讨。

反转录反应

Step	温度	时间	检出	说明
反转录	55-65°C	2-5 分钟	OFF	依据目的基因不同调整温度会有改善的情况。不同的目的基因也可能有缩短时间的情况。

PCR 反应 30–45 cycles

Step	温度	时间	检出	说明
变性	95–98°C	3–5 秒	OFF	根据仪器及目的基因不同，适宜的变性温度不同。95°C反应效果差时，请在 96–98°C的范围内研讨。Real Time PCR 的扩增片段大小一般在 300 bp 以下，因此 3–5 秒即可。
退火/延伸	55–65°C	15–30 秒	ON	优化反应条件时，请在 55–65°C的范围内研讨。反应性能差时，延长此步骤的反应时间 (> 30 秒) 有改善的情况。不同的目的基因也可能有缩短时间的情况。

*1: 请在室温下融解试剂、制备反应液。冰上融解时，有可能会看到有析出的情况。

*2: 通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到理想的结果，反应性能差时，可以在 0.1~1.0 μM 的范围内调整引物浓度。

*3: 探针的浓度，随使用的 Real Time PCR 仪器的型号和探针的荧光标记物质不同而不同。请参考探针附带的说明书等信息研讨添加量。使用 Thermal Cycler Dice Real Time System 时，通常终浓度在 0.1~0.5 μM 的范围内研讨。

*4: 样品添加量在反应液总量的 1/10 以下，或 10 pg–1 μg 的添加范围内，能得到理想的结果。目的核酸浓度低时，样品添加量可以使用超过反应液总量 1/10，但需注意可能会对 RT–qPCR 反应有阻害作用。

*5: 按照各仪器的推荐量调整。

*6: 使用 ROX Reference Dye，请参考下表：

使用ROX Reference Dye (50X) 的仪器
◆ 添加 ROX Reference Dye (终浓度 0.5X) ABI StepOnePlus
◆ 添加 ROX Reference Dye II (终浓度 0.5X) ABI7500 Fast
不添加 ROX Reference Dye 的仪器
· Thermal Cycler Dice Real Time System 系列 · Bio–Rad CFX 系列 · Roche LightCycler 系列

*7: 怀疑有交叉污染时，进行该操作。通过 UNG 的作用，分解交叉污染的 PCR (含 dUTP) 产物。

*8: 此步骤是必要的，必须进行 90°C 3 分钟或 95°C 30 秒的变性。

*9: 根据仪器不同，可能存在检出步骤不能设置在 30 秒以内的情况。此时，请按照该仪器能设定的秒数设置 (31 秒，34 秒等)。

● 附录：RNA 样品的制备

本制品是经 RNA 起始合成 cDNA，进行 PCR 扩增的试剂盒。为使 cDNA 成功合成，需要尽量抑制样品中含有的 RNase 的作用，同时也要尽量避免使用的器具溶液等外部原因混入的 RNase。制备 RNA 时，为防止实验者的汗液及唾液中含有的 RNase 的混入，操作过程中尽量不说话，同时佩戴一次性手套，并预设 RNA 制备专用的实验台。

【器具】

实验器具相关，尽量使用一次性的塑料制品。

【溶液】

使用的溶液、不含核酸酶的灭菌水全部作为 RNA 实验专用试剂。

● 关联产品

RNase-free Water (Code No. 9012)

Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950 等)

PrimeDirect is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Thermal Cycler Dice is a trademark 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>

v202207Da