

Code No. TCH007/TCH011

研究用

TaKaRa

Fast One Step Probe RT-qPCR Mix

中文名：一步探针法快速 RT-qPCR 预混液

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 试剂原理	1
● 制品内容	2
● 试剂盒外必备主要试剂和仪器	3
● 保 存	3
● 特 长	3
● 操作注意	3
● 使用注意	4
● 操作方法	4
● 关联产品	9

● 制品说明

Fast One Step Probe RT-qPCR Mix 是采用探针法 (5' nuclease 法) 进行 1 step Real Time RT-qPCR 的专用快速试剂盒。本制品是 2X Premix 型, -20℃保存时不会冻结, 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。反转录反应和 qPCR 反应在单个反应管中连续进行, 操作简单。反转录反应使用新型的 PrimeScript™ III RTase, 该酶在维持 PrimeScript RTase 的特异性和延伸性的同时, 进一步提高了耐热性能 (高达 55℃), 对于以具有复杂二级结构 RNA 起始的 cDNA 合成反应能够发挥更佳作用。cDNA 合成后, 使用 TaKaRa Taq™ HS 进行高特异性及高扩增效率的 PCR, 通过荧光标记的探针进行 Real Time 检出。此外, 本制品对高 GC 含量的靶基因以及粗提样本也有很好的扩增。本制品是一种 2X 浓度的 Premix 型试剂, 配制 One Step RT-PCR 反应液十分简便。

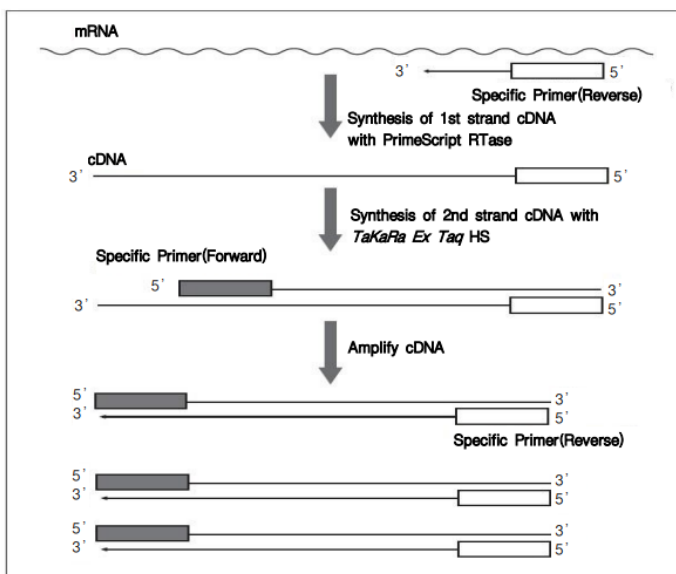
● 试剂盒原理

本制品首先使用反转录酶 PrimeScript III RTase 将 RNA 转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板使用 TaKaRa Taq HS 在同一反应管内连续进行 Real Time PCR 扩增反应, 通过探针的荧光信号进行实时监测。

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。

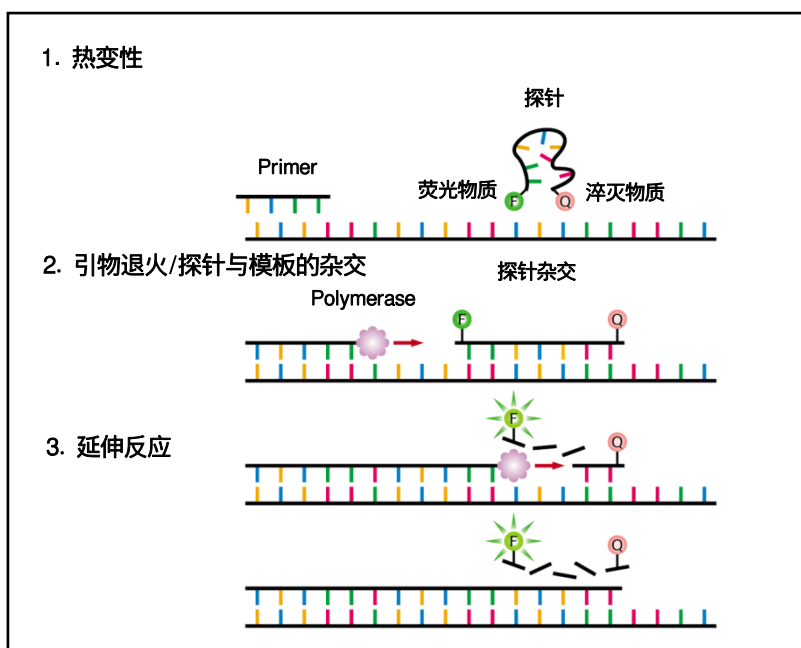
One Step RT-PCR 先使用 PCR 用特异性引物 (Reverse) 进行反转录反应, 然后以合成的 cDNA 为模板, 经特异性引物 (Forward, Reverse) 进行 PCR 扩增, 整个反应在同一个反应管中连续进行。



One Step RT-PCR 的原理

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, Taq 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 (TCH007: 25 μ l 反应 $\times$ 200 次量; TCH011: 25 μ l 反应 $\times$ 50 次量)

	TCH007	TCH011
Fast One Step Probe RT-qPCR Mix (2X)	625 μ l $\times$ 4	625 μ l
RNase Free H ₂ O	1.25 ml $\times$ 2	1.25 ml
ROX Reference Dye (50X Conc.)*	100 μ l	40 μ l
ROX Reference Dye II (50X Conc.)*	100 μ l	40 μ l

*: 使用在 Applied Biosystems 等 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

StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆ 使用 ROX Reference Dye II (50X) 的 PCR 仪

7500 Fast Real-Time PCR System

Applied Biosystems™ QuantStudio 3/5 Real-Time PCR System (以上 Thermo Fisher Scientific)

◆ 不需要使用 ROX 的 PCR 仪

Thermal Cycler Dice™ Real Time System IV (Code No. TP1000)

Thermal Cycler Dice Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)

Thermal Cycler Dice Real Time System III/Lite (Code No. TP900/TP960、TP700/TP760: 终卖)

CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (Code No. 640231/640232)

LightCycler 96/480 System (Roche Diagnostics)

CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

Gentier 96E/96R 全自动医用 PCR 分析系统 (西安天隆科技)

● 试剂盒外必备主要试剂和仪器

1. Real Time PCR 扩增仪 (authorized instruments)

【本制品适用的机型】

- Thermal Cycler Dice Real Time System IV (Code No. TP1000)
 - 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)
 - CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (Code No. 640231/640232)
 - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
 - Applied Biosystems™ QuantStudio™ 3/5 Real Time PCR System、7500 Fast Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
 - LightCycler 96/480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics)
 - Gentier 96E/96R 全自动医用 PCR 分析系统 (西安天隆科技)
- ### 2. 实验专用反应管或反应板
- ### 3. PCR 引物
- ### 4. 检测用探针 (Dual Labeled Probe, etc.)
- ### 5. PCR 模板
- ### 6. 灭菌水
- ### 7. 微量移液器和枪头

● 保 存: -20℃

● 特 长

1. 快速的扩增能力: 支持快速反应程序, 可在 23 min 内 (仪器快速模式) 进行可信度高的定量 PCR 分析, 提高检测效率。
2. RNA 模板使用范围更广: 采用新型耐热性反转录酶 PrimeScript III RTase, 可在高温下 (~55℃) 进行反转录反应, 对于以具有复杂二级结构 RNA 起始的 cDNA 合成反应能够发挥更佳作用。
3. 操作简单方便: 本制品是一种 2X 浓度的 Premix 试剂, RT 反应和 PCR 反应在一管中同时进行, 只需要加入引物/探针、模板、RNase Free H₂O 便可通过探针法进行 Real Time PCR 反应。
4. 平台通用: 适用于不同的 qPCR 仪器, 可兼容不同仪器的快速程序。

● 操作注意

以下为使用本试剂时的注意事项, 使用前请一定认真阅读。

1. Fast One Step Probe RT-qPCR Mix (2X) 在使用前通过轻轻颠倒混匀, 避免产生气泡, 并瞬时离心将管盖上附着的液体收集于管底。试剂混合不均匀会造成反应效果不佳。使用后, 立即于 -20℃ 保存。
 - (1) 请勿涡旋振荡混匀。
 - (2) Fast One Step Probe RT-qPCR Mix (2X) 于 -20℃ 保存, 取出时有可能会冻结, 请完全融解后正常使用, 不影响制品品质。
 - (3) Fast One Step Probe RT-qPCR Mix (2X) 当保存过程中如有不溶物, 请轻轻颠倒充分混合, 再使用。
2. 试剂使用前冰上放置。
3. 使用时, 请一定保证所有的试剂、耗材没有污染, 调制场所也要确保没有污染。
4. 试剂分取、反应液的配制 & 分装请务必使用新的一次性枪头, 以避免样品间的污染。
5. 本制品中不含有探针, 请另行准备。

6. 如果探针、引物因混入核酸酶而被降解，则不能准确进行检测。实验者的汗液和唾液也会带入核酸酶，操作时应注意。
7. 当同时需要进行多个 Real Time One Step RT-PCR 反应时，将反应液配制成必要量+α 的混合液（Fast One Step Probe RT-qPCR Mix (2X)，RNase Free H₂O，Primer，Probe 及 RNA 样品）。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。
8. 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。
9. qPCR 反应管请与 Real Time PCR 扩增仪适配。
10. 各 Real Time PCR 扩增仪的分析方法请参见各仪器的使用说明书。当 Real Time PCR 扩增仪的 Auto 功能不适合时，将会导致结果判定错误。此时可参照 Real Time PCR 扩增说明书进行手动设定。

● 使用注意

本制品中使用的 *TaKaRa 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℃、5~15 min 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。PCR 反应前的反转录酶的热变性失活通常设定为 95℃、10 sec。

● 操作方法

请按照各机型的说明书进行操作。RNA的制备方法请参考<RNA样品的制备>

- ◆ [使用Thermal Cycler Dice Real Time System III (// 和*Lite*: 终卖)、Thermal Cycler Dice Real Time System IV、CronoSTAR 96 Real-Time PCR System、CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System、LightCycler 480 Real-Time PCR Detection System、Gentier 96E/96R全自动医用PCR分析系统时的操作方法]

1. 按照下列组分配制RT-PCR反应液（反应液配制请在冰上进行）。

<1个反应>

试剂	使用量	终浓度
Fast One Step Probe RT-qPCR Mix (2X)	12.5 μl	1X
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM ^{*1}
Probe (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM ^{*2}
RNA样品 ^{*3}	≤2.5 μl	
RNase Free H ₂ O	X μl ^{*4}	
Total	25 μl	

2. RT-qPCR反应。

PCR反应管或反应板用离心机轻轻离心后，放入Real Time PCR Detection System中进行PCR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（参照「RT-PCR反应条件说明」）。

Shuttle PCR标准操作流程

Stage 1: 反转录反应

Cycle: 1

52°C 5 min

95°C 10 sec

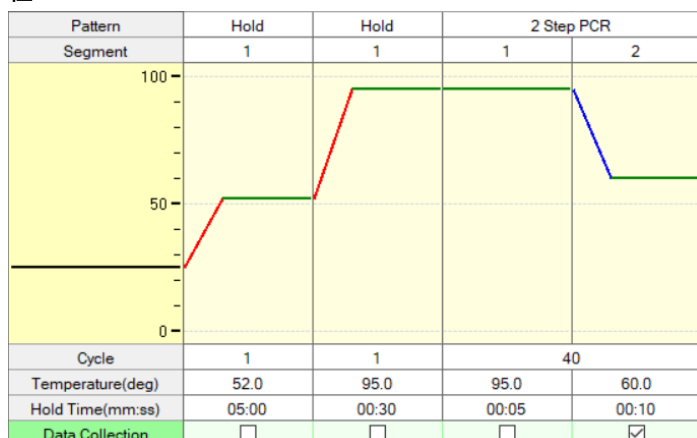
Stage 2: 2 step PCR反应

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 10 sec

实例：使用Thermal Cycler Dice Real Time System (Code No. TP1000/TP950/TP900/TP700) 操作流程



Pattern 1: 反转录反应

52°C 5 min

95°C 10 sec

Pattern 2: PCR反应

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 10 sec

3. 反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线，进行RT-PCR定量时制作标准曲线。

分析方法参见各仪器的操作手册。

*1~*4: 请参考「RT-PCR反应条件说明」

◆ 使用Applied Biosystems QuantStudio5 Real-Time PCR System时的操作方法

注意：请按照仪器的使用说明书进行操作。为减少仪器孔间产生的荧光信号误差，反应体系中需要添加ROX Reference Dye II 进行校正。

1. 按照下列组分配制RT-PCR反应液（反应液配制，请在冰上进行）。

<1个反应>

试剂	使用量	终浓度
Fast One Step Probe RT-qPCR Mix (2X)	12.5 μl	1X
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM ^{*1}
Probe (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM ^{*2}
ROX Reference Dye II (50X) ^{*5}	0.25 μl	0.5X
RNA样品 ^{*3}	≤2.5 μl	
RNase Free H ₂ O	X μl ^{*4}	
Total	25 μl	

2. RT-qPCR反应。

PCR反应管或反应板用离心机轻轻离心后，放入Real Time PCR Detection System中进行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，尝试该操作流程，然后根据需要优化PCR反应条件（参照「RT-PCR反应条件说明」）。

<QuantStudio5 Real-Time PCR System>

Shuttle PCR标准操作流程

Stage 1: 反转录反应

Cycle: 1

52°C 5 min

95°C 10 sec

Stage 2: 2 step PCR反应

Cycle: 40

95°C 5 sec

60°C 10 sec

3. 反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线，进行RT-PCR定量时制作标准曲线。

分析方法参见仪器的操作手册。

*1~*5: 请参考「RT-PCR反应条件说明」

<RT-PCR反应条件说明>

阶段	温度	时间	检测	说明
反转录	42~55°C	5 min	OFF	根据target调整温度时效果会改善。
变性	95°C	10 sec	OFF	反转录酶的热失活通常设置为95°C 10 sec。

PCR反应 循环数: 30~45 cycles

阶段	温度	时间	检测	说明
变性	95°C	3~5 sec	OFF	Real Time PCR的目的片段大小一般在300 bp以下，95°C反应3~5 sec即可。
退火/延伸	56~64°C	10~30 sec	ON	首先按照各仪器说明书推荐的条件进行反应。反应条件在56~64°C范围内进行调整。反应性能较差时，增加这一步的反应时间可能会改善。

*1: 通常引物终浓度为0.2 μ M可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1~1.0 μ M的范围内调整引物浓度。

*2: 使用的探针浓度，根据使用的Real Time PCR扩增仪的型号和探针的荧光标记物不同而不同。

请参考仪器说明书或各荧光探针的具体使用要求进行。使用Thermal Cycler Dice Real Time System III (// 和Lite: 终卖)时，通常探针终浓度在0.1~0.5 μ M的范围内进行调整。

*3: RNA样品的添加量在反应液总量的1/10以下，理想的添加范围是10 pg~1 μ g。目的RNA浓度低时，有可能使用量超过反应液总量的1/10，此时可能会对RT-qPCR反应有阻害作用。

*4: 按照各Real Time PCR仪器的推荐量调整。

*5: 使用ROX Reference Dye，请参考下表：

种类	ROX Reference Dye (50X)	ROX Reference Dye II (50X)
适用仪器	StepOne、StepOnePlus	ABI7500 Fast、QuantStudio 3/5
使用浓度	最终浓度1X使用	最终浓度0.5X使用

不必使用ROX Reference Dye的仪器
Thermal Cycler Dice Real Time System系列、CronoSTAR 96、CFX96、LightCycler、Gentier 96E/96R

<各厂家qPCR仪器最短反应时间实验例>

Target: hACTB

扩增片段长度: 186 bp

厂家	型号	反应通道数	仪器最短 延伸时间	反应总时间	快速反应程序
Takara	TP950	1	9 sec	<31 min	52℃ 1 min 95℃ 10 sec 2 step PCR: 40 cycles 95℃ 1 sec 60℃ xx* sec *: 按照各仪器最短延伸时间反应
Takara	TP1000	1	10 sec	<26 min	
Bio-Rad	CFX96	1	1 sec	<36 min	
Thermo Fisher Scientific	QuantStudio 5	2	5 sec	<23 min	
Takara	CronoSTAR 96	6	10 sec	<33 min	
Roche	LC480	1	1 sec	<33 min	
西安天隆	Gentier 96E	6	10 sec	<33 min	

<RNA样品的制备>

本试剂盒是由RNA起始合成cDNA，然后进行PCR扩增的试剂盒。为成功合成cDNA，需要抑制样品中含有的RNase的作用，同时需要避免由使用的器具及溶液等外部引入的RNase污染。制备RNA时，为避免实验者的汗液或唾液中含有的RNase的混入，操作中应注意尽量不说话，同时戴好一次性手套，且使用RNA操作专用实验台等。

[实验器具]

尽量使用一次性塑料器具。

[溶液]

使用的试剂、灭菌水等全部作为RNA实验专用使用。

[RNA 制备方法]

由于本制品对于各反应阻害物有很高的耐受性，多数情况下，简易提取试剂粗提的RNA样品起始的反应也能正常进行。但是，如果出现不能正常检出，或者需要准确度更高、稳定性更好的结果时，推荐使用纯度更高的RNA样品。从培养细胞及组织样品中提取高纯度total RNA时，推荐使用纯度更高的RNA样品。从培养细胞及组织样品中提取高纯度total RNA时，也可以使用spin column型的NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250)或AGPC等的简便试剂RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)。

<实验例：高GC含量模板扩增>

Target Gene: ApoE (GC含量为64.52%)

模板量: 以10 pg-100 ng的RNA量作为模板。

反应条件:

Stage 1: 反转录反应

Cycle: 1

52°C 5 min

95°C 30 sec

Stage 2: 2 step PCR反应

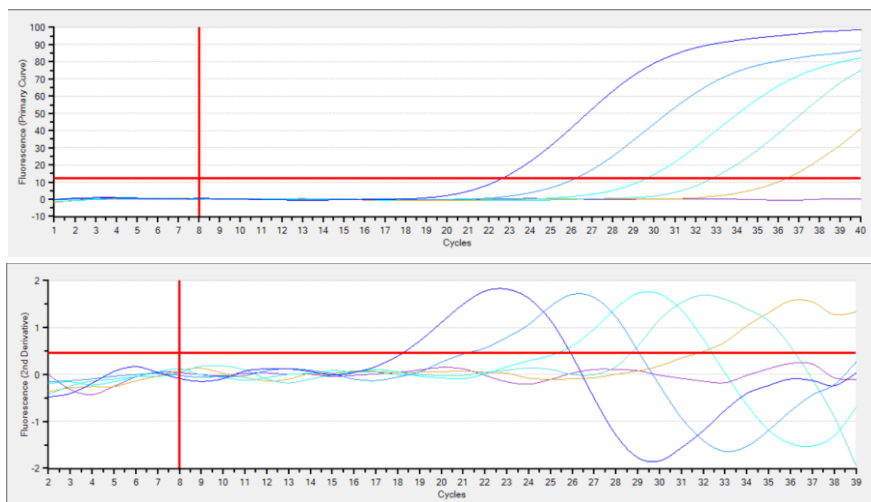
Cycle: 40

95°C 5 sec

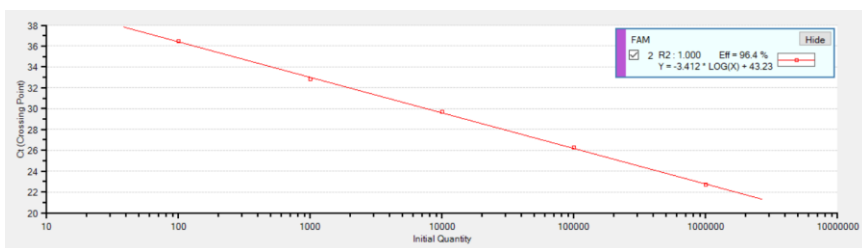
60°C 10 sec

结果:

扩增曲线



标准曲线



● 关联产品

RNase-free water (Code No. 9012)

NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250)

NucleoSpin RNA Plus (Code No. 740984.10/.50/.250)

NucleoSpin RNA Virus (Code No. 740956.10/.50/.250)

RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

Thermal Cycler Dice™ Real Time System IV (Code No. TP1000)

Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)

CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (Code No. 640231/640232)

CronoSTAR™ Portable Real-Time PCR System (Code No. 640245/640247/640249)

PrimerScript, *TaKaRa Taq*, CronoSTAR, 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。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司制作，最新版本文件请参考 Takara Bio（中国）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>