

Version 1

Cat No. AG11712

Pro Taq HS 预混型 探针法 qPCR 试剂盒 II

Pro Taq HS Premix Probe qPCR Kit II

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。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本制品是采用探针法进行 qPCR 的专用试剂，是一种 2X Premix 试剂，反应液配制十分简单。本制品采用了反应性能优越的 *Pro Taq* HS 体系（混合了 Taq 抗体）能够有效抑制非特异性扩增，提高 PCR 扩增效率，可以进行高灵敏度的 Real Time PCR 反应，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，从而对靶基因进行准确定量、检测。同时，对反应 Buffer 进行了优化，适用性广，可用于各种模板的扩增，尤其适合复杂模板的扩增。

➤ 产品组成

| 组分名称 | AG11712 (500 rxns / 20 μ l) |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 2X <i>Pro Taq</i> HS Probe Premix II | 1 ml X 5 pc |

➤ 保存

保存温度：-20°C

运输温度：干冰或-20°C冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本制品是一种 2X 预混液，反应液配制十分简单，仅需加入引物、模板、探针及 RNase free water 即可进行 qPCR 反应。
2. 本制品采用了性能优越的 *Pro Taq* HS 及优化的反应体系，具有特异性强、扩增效率高的特性。
3. 本制品 Buffer 经过优化，适合复杂模板的扩增。

➤ 实验原理

1. PCR 扩增原理

PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

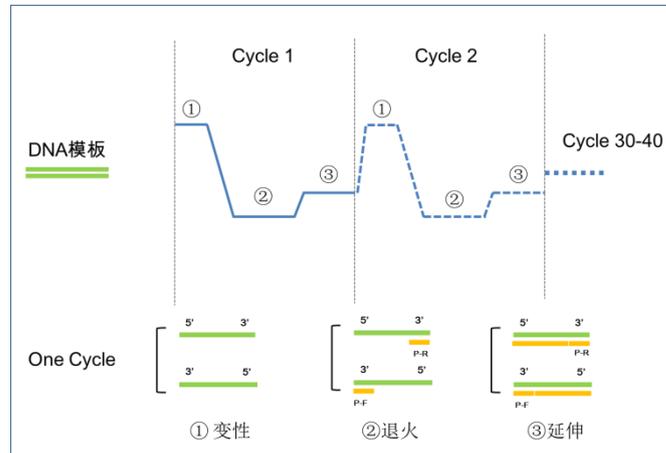
扩增详情如下图：

一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30-40 次。

步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

步骤②：引物与单链 DNA 进行退火；

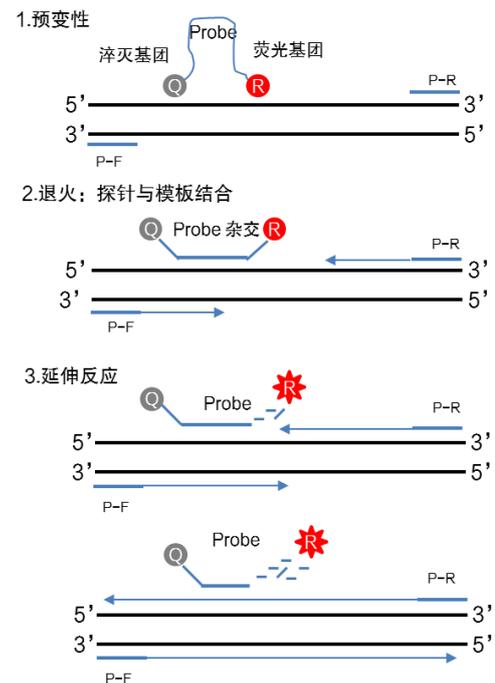
步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸，与单链 DNA 形成互补链；



2. 荧光探针 qPCR 检测原理：

荧光探针检测所用的探针在 5' 端标记有荧光物质(如：FAM)，3' 端标记有淬灭基团(如：BHQ)，当探针保持完整时，5' 端荧光报告基团发射的荧光受 3' 端淬灭基团淬灭，不能发出荧光信号；但是当探针被分解后，5' 端荧光报告基团与 3' 端淬灭基团分离，释放荧光信号。

在 PCR 反应过程中，退火时荧光探针会与待检测模板杂交；延伸时，Taq DNA 聚合酶的 5'-3' 外切酶活性可以分解杂交的荧光探针，使得 5' 端荧光报告基团游离出来，进而释放荧光信号。通过检测反应体系中的荧光信号强度，达到对目的基因进行定量分析的目的。



➤ 使用注意事项

- 请仔细阅读所用定量 PCR 仪器设备操作手册，根据仪器操作手册进行操作。
- 本制品中未配有 ROX Reference Dye，如果反应中需要添加 ROX Reference Dye 用以校正孔间荧光信号值误差，可选择如下产品配合使用：（请根据仪器设备说明书要求确定是否需要添加 ROX Reference Dye）
 - ROX Reference Dye (20 μ M) (AG11703)
 - ROX Reference Dye (4 μ M) (AG11710)
 注：上述 ROX Reference Dye 产品建议 50X 稀释使用（例如，50 μ l 反应体系中添加 1 μ l ROX Reference Dye），如果实验结果不理想，可调整 ROX Reference Dye 添加量。
- 产品避免反复冻融，防止酶活降低；使用前可上下颠倒混匀，请勿涡旋振荡混匀，防止酶活降低，同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。
- 本制品中不含探针。
- 产品-20 $^{\circ}$ C 存放可能会产生淡黄色或白色沉淀，使用前可于冰上溶解或手握放置，颠倒混匀至沉淀全部消失。请勿使用涡旋振荡。

➤ 实验前准备

1) 试剂 & 耗材：

Primer，探针引物，PCR grade water、定量 PCR tube、带滤芯枪头。

2) 仪器：

| | 仪器 |
|-----------------------------------|---|
| 无需添加 | (Bio-Rad) IQ5, CFX96, CFX384, CFX Connect, MJOpticon, Opticon 2; (Cepheid) SmartCycler [®] System, Smart Cycler II System; (Roche) LightCycler [®] 2.0, 480, 96; (Qiagen) Rotor-Gene Q, 3000, 6000; (Bioer) Line-Gene; (Eppendorf) Mastercycler ep realplex; (Analytik Jena) qTOWER3; |
| 添加 AG11703 (终浓度为 0.4 μ M) | (Thermo) ABI7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus; |
| 添加 AG11710 (终浓度为 0.08 μ M) | (Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA 7, QuantStudio 3 / 5, QuantStudio 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio [™] Dx; (Agilent) Mx3000P, Mx3005P, MX4000; |

➤ 操作方法

(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems 为例)

1) 配制 PCR 反应液

| 组分名称 | 20 μl 体系 | 50 μl 体系 |
|--|--------------|--------------|
| 2X <i>Pro Taq</i> HS Probe Premix II | 10 μl | 25 μl |
| Template ^{*1} | <100 ng | < 250 ng |
| Primer F (10 μM) ^{*2} | 0.4 μl | 1 μl |
| Primer R (10 μM) ^{*2} | 0.4 μl | 1 μl |
| Probe ^{*3} | 0.1 – 0.8 μM | 0.1 – 0.8 μM |
| ROX Reference Dye (4 μM) ^{*4,5} | 0.4 μl | 1 μl |
| RNase free water | Up to 20 μl | Up to 50 μl |

*1: 在 20 μl 体系里, DNA 模板添加量通常在 100 ng 以下, 必要时可以进行梯度稀释, 以确定合适的模板添加量; 如果使用本制品进行 cDNA 的定量 PCR 扩增, cDNA 原液使用体积不要超过定量 PCR 反应总体积的 10%。

*2: 引物通常使用终浓度为 0.2 μM, 也可以在 0.1 – 1.0 μM 范围内调整。

*3: 探针引物浓度与使用的定量 PCR 仪、荧光标记物质种类有关, 请参照仪器说明书及荧光探针的具体使用要求调整。通常探针引物终浓度可在 0.1 – 0.8 μM 范围内进行调整。

*4: 请按照不同仪器推荐的反应体系配制反应液。如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准, 请按照仪器推荐量添加。

*5: 若不需要使用 ROX 的 PCR 仪, ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。

2) qPCR 反应条件

两步法 PCR 反应程序^{*1}:

| | 温度 | 时间 | cycles |
|--------|------|----------------------|--------|
| Step 1 | 95°C | 30 sec ^{*2} | 1 |
| Step 2 | 95°C | 5 sec | } 45 |
| | 60°C | 30 sec ^{*3} | |

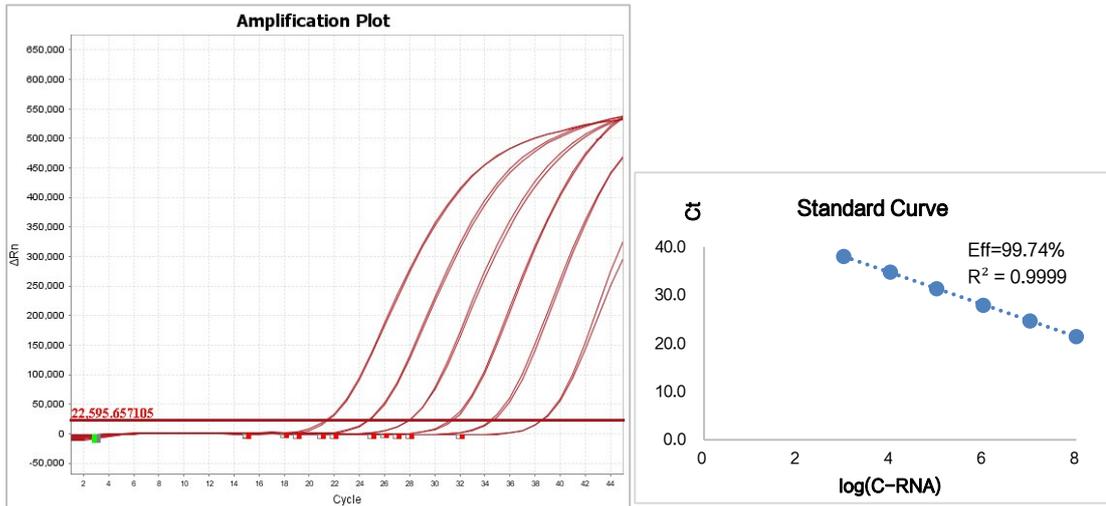
*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件; 如果引物 T_m 值较低, 导致两步法扩增效率较差, 可采用三步法进行 PCR 扩增。

*2: 预变性时间通常设定为 30 sec, 如果模板变性困难, 可以延长预变性时间至 1~2min。

*3: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增延伸反应条件设定为 60°C、30 sec 时可以满足要求; 如需提高反应特异性, 可适当提高退火温度; 如需提高扩增效率, 或者 PCR 扩增产物较长, 则可将反应延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。

➤ 实验例

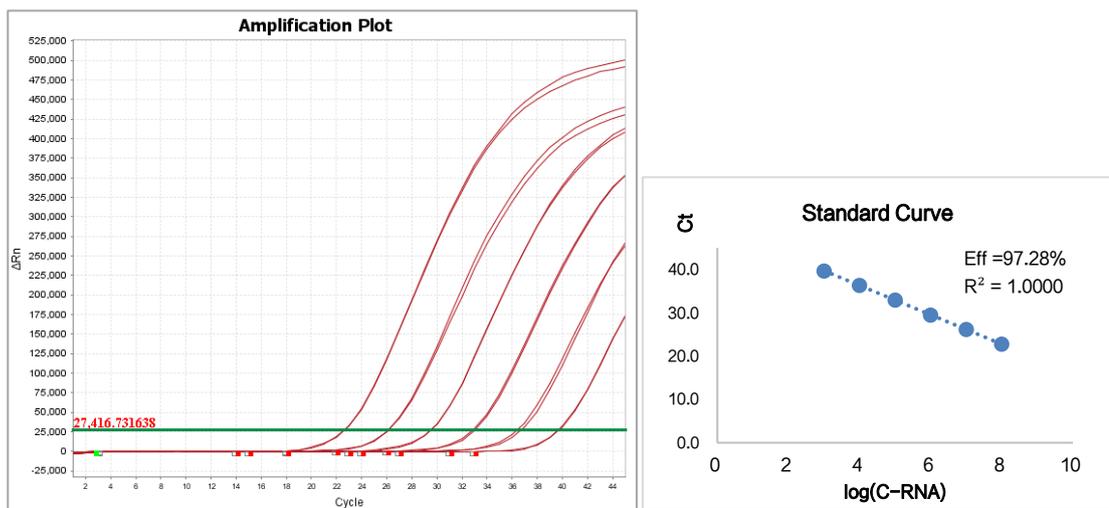
1. 采用本试剂盒进行荧光探针 qPCR 方法检测 Human *TFRC* Gene (GC 含量 38%) , 模板 cDNA 添加量 (相当于 Total RNA 量) 为 100 ng ~ 1 pg。cDNA 的合成使用本公司 *Evo M-MLV* 反转录试剂盒 II (含去除 gDNA 试剂, 用于 qPCR) (Code.AG11711)。所用定量仪器: ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。



结果如上图所示: 1、扩增效率为 99.74%, $R^2=0.9999$;

- 2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量, 100 ng ~ 1 pg cDNA (相当于 Total RNA 量) 范围内扩增曲线呈现良好的线性关系。

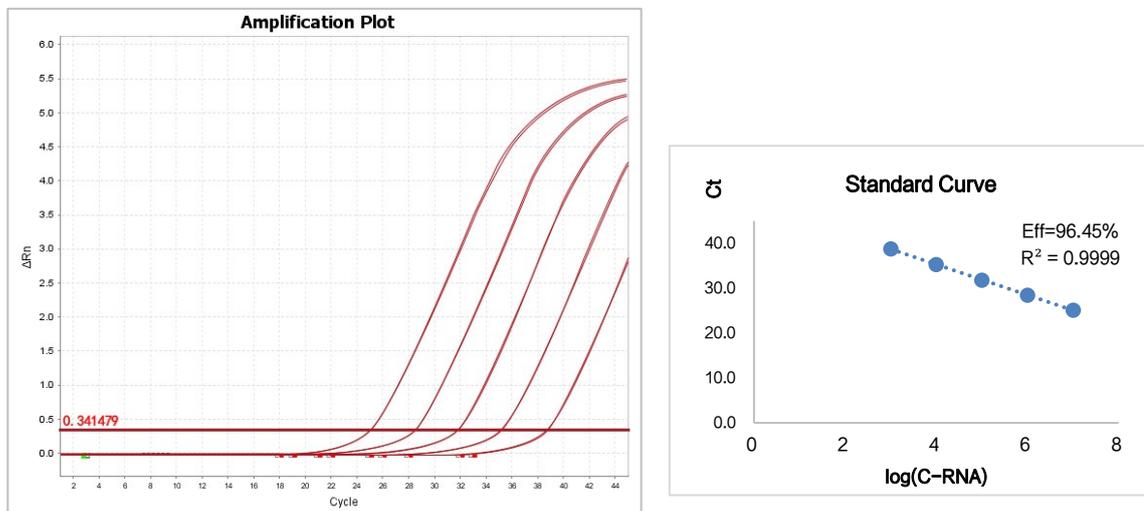
2. 采用本试剂盒进行荧光探针 qPCR 方法检测 Human *RPP30* 基因 (GC 含量 61.6%) , 模板 cDNA 添加量 (相当于 Total RNA 量) 为 100 ng ~ 1 pg。cDNA 的合成使用本公司 *Evo M-MLV* 反转录试剂盒 II (含去除 gDNA 试剂, 用于 qPCR) (Code.AG11711)。所用定量仪器: ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。



结果如上图所示: 1、扩增效率为 97.28%, $R^2=1.0000$;

- 2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量, 100 ng ~ 1pg cDNA (相当于 Total RNA 量) 范围内扩增曲线呈现良好的线性关系。

3. 采用本试剂盒进行荧光探针 qPCR 方法检测 Pig *TGFB1* 基因 (GC 含量 70.9%)，模板 cDNA 添加量 (相当于 Total RNA 量) 为 10 ng ~ 1 pg。cDNA 的合成使用本公司 *Evo M-MLV* 反转录试剂盒 II (含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR) (Code.AG11711)。所用定量仪器：ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。



结果如上图所示：1、扩增效率为 96.45%， $R^2=0.9999$ ；

- 2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量，10 ng ~ 1 pg cDNA (相当于 Total RNA 量) 浓度范围内扩增曲线呈现良好的线性关系。

➤ 产品注意事项

1. 合适的模板加入量及浓度

- ❖ 模板量低：导致扩增结果 Ct 值较大，荧光信号值较低，PCR 反应扩增效率较低，反应结果重复性较差。可适当提高模板反应量。
- ❖ 模板量高：导致 Ct 值太小、扩增荧光信号值太高，扩增曲线异常；适当降低模板量。
- ❖ 模板浓度高：模板取液量体积较小，导致模板加样体积不准，实验重复性差；将模板适当稀释后加样。

2. 高纯度及完整的模板

- ❖ 模板不纯：①含有抑制 PCR 反应的物质，会导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。②RNA 模板中混有基因组 DNA，可能影响结果准确性。可重新纯化模板。
- ❖ 模板降解：导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。可重新制备模板，重复实验。

3. 合适的引物浓度

- ❖ 引物浓度低：导致反应效率低，Ct 值较大。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度高：导致反应特异性不好。可适当降低引物浓度。

- ❖ 引物完整性不好：可能会导致无扩增曲线，可通过 PAGE 电泳确认引物的完整性，如引物有降解，建议更换引物。
- ❖ 引物设计的原则：
 - ① 引物一般是 15-30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40 - 60 % 之间。
 - ② 建议正反向引物 Tm 值在 50-70°C，两引物 Tm 值相差不超过 5°C。
 - ③ 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
 - ④ 引物 3' 端避免出现发夹结构。
 - ⑤ 减少引物之间的互补序列，最好不要超过 4 个碱基连续互补序列。

4. 合适的探针引物

- ❖ 探针引物浓度过高：可能会导致背景值偏高；若进行多重定量 PCR 检测，易造成探针之间相互干扰。
- ❖ 探针引物浓度过低：可能会导致荧光信号值偏低，Ct 值偏大。
- ❖ 探针引物设计的原则：
 - ① 探针引物长度一般 18-40 bp。
 - ② 探针 5' 端尽量避免使用 G 碱基，因其具有淬灭荧光的能力。C 碱基比 G 碱基多的探针效果更好，如果 C 数量少于 G 数量，选择其互补链。
 - ③ 应避免探针中多个重复的碱基出现，尤其是要避免 4 个或超过 4 个的 G 碱基出现。
 - ④ 探针引物的 Tm 值通常比扩增引物 Tm 值高 10°C，一般控制在 65°C~70°C 左右。
 - ⑤ 探针引物尽量靠近扩增引物，但不可与之重叠。

5. 合适的退火温度

- ❖ 退火温度过低：导致反应特异性不好或出现引物二聚体。适当提高退火温度。
- ❖ 退火温度过高：导致扩增效率低，无扩增曲线。适当降低退火温度。

6. 实验细节

- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡。
- ❖ 本产品-20°C 存放可能会产生淡黄色或白色沉淀，使用前确保完全融化并混匀。
- ❖ 确认 ROX 与仪器是否匹配，ROX 使用前确保完全融化并混匀。
- ❖ 检查反应程序，确保反应程序设置正确。