

Version 6

Code No. AG11704

Pro Taq HS

预混型探针法 qPCR 试剂盒

Pro Taq HS

Premix Probe qPCR Kit

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

本产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。本产品的 PCR 反应体系经过了优化，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工作曲线，从而对靶基因进行准确的定量检测。

➤ 产品组成

组分名称	AG11704 (500 rxns / 20 μ l)
2X <i>Pro Taq</i> HS Probe Premix	1 ml X 5 pcs

➤ 保存及运输

保存温度：-20°C 保存

（避光保存，长期保存放置在 -20°C，产品融化后可于 4°C 保存 6 个月。）

运输温度：干冰运输或 -20°C 冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品是一种 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. 本产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。

➤ 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。

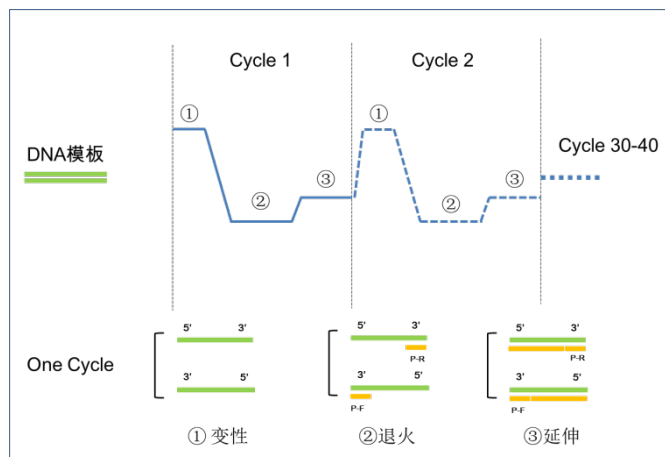
扩增详情如下图：

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；

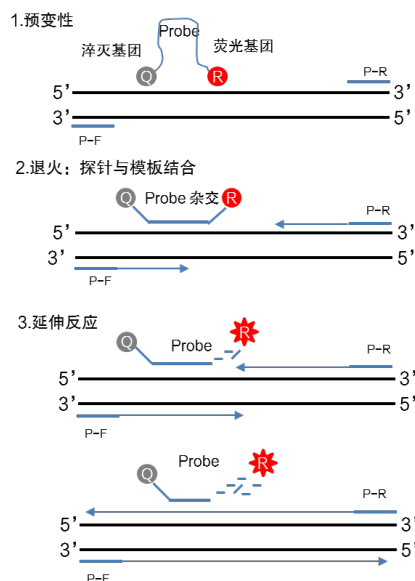
步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸，与单链 DNA 形成互补链。



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' 端标记有淬灭物质（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。
- 本产品中未配有 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 μl 反应体系中添加 1 μl 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。
- 本产品中不含探针。
- 产品-20℃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、RNase free 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 Cyler II System; (Roche) LightCycler® 2.0, 480, 96; (Qiagen) Rotor-Gene® Q, 3000, 6000; (Bioer) Line-Gene; (Eppendorf) Mastercycler ep realplex; (Analytik Jena) qTOWER3; (TaKaRa) Thermal Cycler Dice™ TP700, TP760, TP900, TP960, TP950, TP970, TP980, TP990;
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 System 为例)^{*1}

1) 配制 PCR 反应液

组分名称	20 μl 体系	50 μl 体系
2XPro Taq HS Probe Premix ^{*2}	10 μl	25 μl
Template ^{*3}	≤100 ng	≤200 ng
Primer F (10 μM) ^{*4}	0.4 μl	1 μl
Primer R (10 μM) ^{*4}	0.4 μl	1 μl
Probe ^{*5}	0.1 ~ 0.5 μM	0.1 ~ 0.5 μM
ROX Reference Dye (4 μM) ^{*6}	0.4 μl	1 μl
RNase free water	Up to 20 μl	Up to 50 μl

*1: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。

*2: 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。

*3: 在 20 μl 体系里, DNA 模板添加量通常不高于 100 ng, 必要时可以进行梯度稀释, 以确定合适的模板添加量; 如果使用本产品进行 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%。

*4: 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。

*5: 探针浓度与使用的定量 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。通常探针终浓度可在 0.1 ~ 0.5 μM 范围内进行调整。

*6: 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。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}:

步骤	温度	时间	循环数
Step 1	95°C	30 sec ^{*2}	1
Step 2	95°C	5 sec	40
	60°C	30 sec ^{*3}	

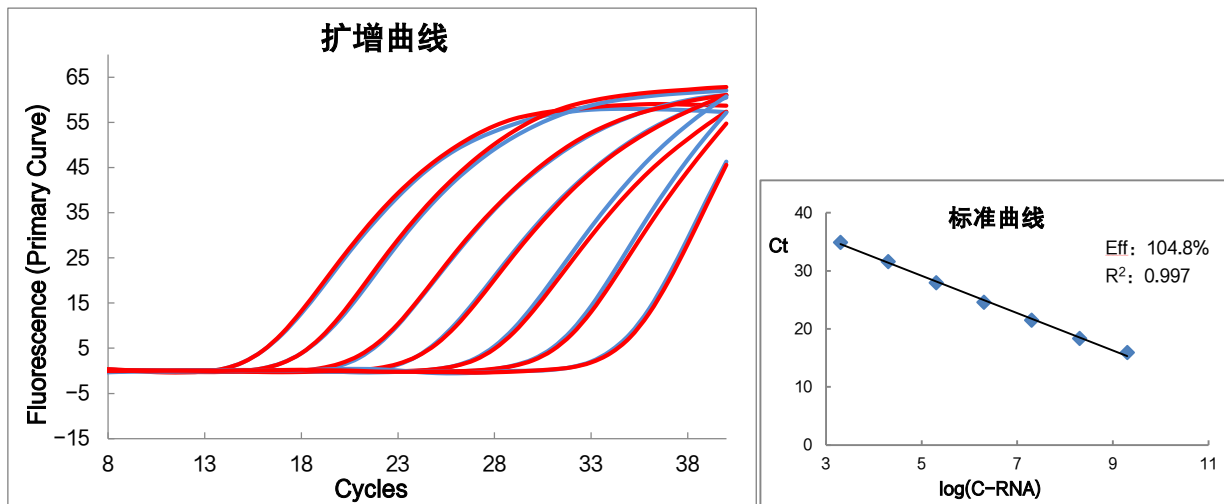
*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件; 如果引物 Tm 值较低, 导致两步法扩增效率较差, 可采用三步法进行 PCR 扩增。

*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

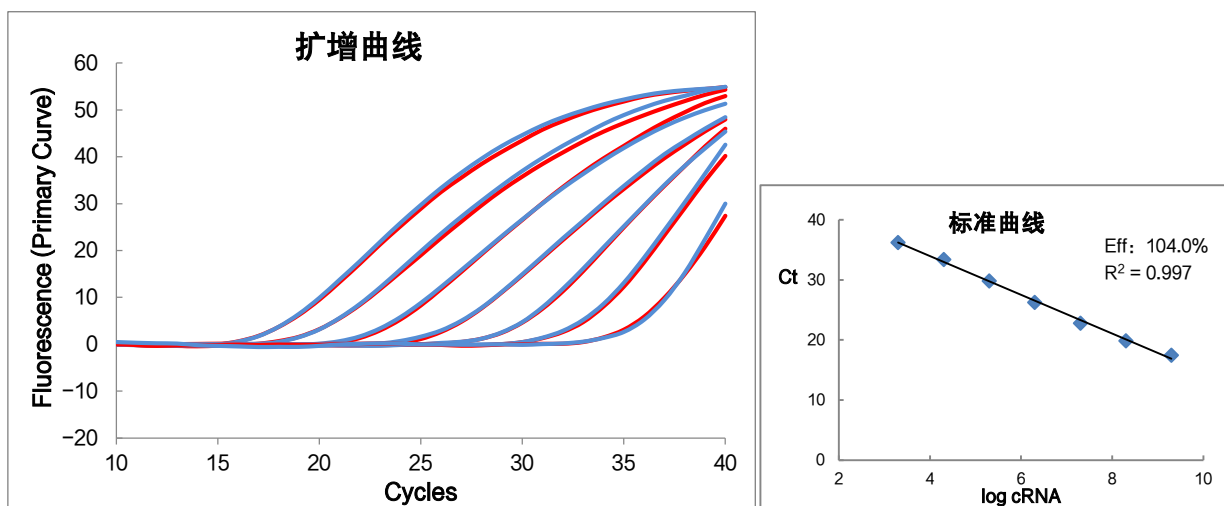
1. 采用本产品进行荧光探针 qPCR 方法检测 Human β -actin 基因，模板 cDNA 添加量（相当于 Total RNA 量）为 200 ng ~ 0.2 pg。cDNA 的合成使用本公司 *Evo M-MLV* 反转录试剂盒（含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR）(Code No. AG11705)。



结果如上图所示：1、扩增效率为 104.8%， $R^2=0.997$ ；

- 2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量，200 ng ~ 0.2 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。

2. 采用本产品进行荧光探针 qPCR 方法检测小鼠 *GAPDH* 基因，模板 cDNA 添加量（相当于 Total RNA 量）为 200 ng ~ 0.2 pg。cDNA 的合成使用本公司 *Evo M-MLV* 反转录试剂盒（含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR）(Code No. AG11705)。



结果如上图所示：1、扩增效率为 104.0%， $R^2=0.997$ ；

- 2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量，200 ng ~ 0.2 pg cDNA（相当于 Total RNA 量）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，扩增曲线形状异常。可适当提高模板量。
- ❖ 模板量高：导致 Ct 值太小、扩增荧光信号值太高，扩增曲线形状异常。可适当降低模板量。
- ❖ 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；可将模板适当稀释后加样。

2. 高纯度及完整的模板

- ❖ 模板不纯：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。可对模板重新提纯。针对 cDNA 的定量反应中，熔解曲线出现多峰，可能是 RNA 模板中混有基因组 DNA，导致反应特异性不好。可先使用本公司的 *Evo M-MLV* 反转录预混型试剂盒（含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR）(Code No. AG11728) 去除模板中的基因组 DNA。
- ❖ 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，熔解曲线出现多峰。可适当降低引物浓度。
- ❖ 引物特异性不好：导致反应特异性不好，易形成了引物二聚体，熔解曲线出现多峰。建议重新设计引物。
- ❖ 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 小于 G，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。

➤ 附录：三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
Step 1	95°C	30 sec	1
Step 2	95°C	5 sec	40
	55°C	30 sec	
	72°C	30 sec	