

高效率 One-step qRT-PCR Kit

THUNDERBIRD[®]
Next Probe One-step
qRT-PCR 4xMix
(Code No. QRX-101)

使用说明书

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

TOYOBO

— 目录 —

[1] 简介	1
[2] 产品内容	2
[3] 除产品以外需要准备的物品	3
[4] 使用方法	4
1. 引物及 TaqMan® 探针的设计方法与性能确认	4
2. 反应液制备	5
3. 循环条件设定	6
[5] 冻干 PCR · RT-PCR 试剂制备	7
1. 冻干前的 PCR · RT-PCR 试剂制备示例	7
2. 冻干机的冻干过程	7
[6] 实验案例	8
[7] 常见问题	10
[8] 相关产品	12

注意

使用本产品时，应严格遵守实验室注意事项并采取安全防范措施。请遵守各试剂所附带的注意事项以及设备和仪器所附带的操作手册中的说明，并在必要时使用适当的防护设备。

※本文件中提及的其他公司名称、产品名称和商标均为各公司的商品名称、商标或注册商标。

[1] 简介

THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4×Mix 是以高效逆转录酶 ReverTra Ace®以及 DNA Polymerase 作为 PCR 酶的双酶体系, 进行 TaqMan®分析法的一步法 Realtime RT-PCR 试剂盒。

该产品将逆转录酶、PCR 酶和反应缓冲液合为一体, 只需简单操作即可完成反应溶液的配制。此外, 由于逆转录反应和 PCR 是在同一反应系统中连续进行的, 因此只需进行一次上机操作即可, 使其适用于高通量, 此外也降低了样本间交叉污染的风险。

本产品由于采用了高效酶, 可实现更快速、更灵敏的反应。即使存在 PCR 抑制物 (如生物成分), 也可以进行高效扩增。并且可以同时检测多个基因。

此外, 该产品包含无甘油赋形剂, 可以进行冻干操作。冻干后可在室温条件下稳定保存, 运输时无需使用制冷剂。并且, 在加入模板和水之后, 即可立即进行 Realtime PCR。经过实验确认, 冻干操作完全不会影响产品的性能。

◆本产品的特点◆

1. 迅速·高灵敏度

通过使用探针一步法的 qRT-PCR, 可迅速且高灵敏地对微量 RNA 进行定量。尤其适合于对 RNA 病毒及低表达量 mRNA 的定量。同时, 本产品可以达到【延伸时间为 10 秒的高速循环】, 其扩增性能和【延伸时间为 45 秒的普通循环】无差异。

2. 操作简便

THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4×Mix, 由于将逆转录酶、DNA Polymerase, dNTP 以及反应 buffer 合为一体, 节省了反应液制备的时间, 降低了污染和移液操作误差的风险。

3. 优秀的抑制物耐受性

采用了抗抑制性能强的高效酶, 即使存在 PCR 的抑制物 (如生物成分), 也能进行高效扩增。

4. 使用 dUTP

本产品 THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4×Mix 中含有 dUTP。在添加 Uracil-N-Glycosylase (UNG)*后, 可防止因 carryover 污染造成假阳性结果。

*本产品中不含 UNG。可使用另外销售的 Uracil-DNA Glycosylase (UNG),

Heat-labile (Code No. UNG-101)。

5. 可同时检测多个目的基因

通过使用不同检测波长的 TaqMan® 探针可以同时检测多个目的基因。可在同一反应内检测内参基因和目的基因，从而迅速简便地进行高准确率的基因定量。

6. 可制备冻干试剂

本产品不含干扰冻干的甘油，同时加入了冻干所需的赋形剂。经确认，冻干后其性能也不会受到影响。

7. 快速热启动

采用了抗 DNA 聚合酶抗体的热启动体系。通过该热启动方法，可抑制非特异性反应。另外，通过加热，抗体会快速失活，使酶迅速活化，将高温对酶的损害降到了最低。

[2] 产品内容

本产品中含有以下组分。

THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4×Mix
(Code No. QRX-101)

产品名称及内容	保存	QRX-101 (250 次份*)
THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4×Mix	-20° C	1.25 mL
50×ROX reference dye	-20° C	100μL

*20μL 反应体系

THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4×Mix

- 本产品中包含了反应 buffer、逆转录酶、DNA Polymerase、dATP、dCTP、dGTP、dUTP 等组分，是 4×浓度的反应溶液。
- 请通过添加引物探针、模板 RNA、水，配制成 1×浓度使用。
- 融解后充分混合，请混合均匀后使用。

[3] 除产品以外需要准备的物品

除本产品以外，请准备以下试剂及仪器。

1. Realtime PCR 仪器

本产品适用于各种常见的 Realtime PCR 仪器，包括块式 (Block Type)、玻璃毛细管式 (Glass Capillary Type) 等。亦兼容配备 Fast Mode 的仪器。使用时请遵循各仪器的操作手册。

2. 引物及 TaqMan[®] 探针

请准备与目标基因序列相对应的引物及 TaqMan[®] 探针。由于 PCR 中的反向引物也可作为逆转录引物使用，因此无需准备随机引物或 Oligo dT 引物等。

引物的纯化纯度对反应的特异性有显著影响。一般而言，纯化度较低的引物会导致质量波动较大，增加非特异性扩增的可能性。建议尽可能使用 HPLC 纯化，或至少采用柱式 (OPC) 纯化以上级别的高纯度引物。此外，如果 TaqMan[®] 探针的纯度较低，残留的未结合荧光基团可能会对扩增信号的检测产生抑制作用。建议使用 HPLC 纯化以上级别的高纯度 TaqMan[®] 探针。

3. 模板 RNA

本产品支持使用多种类型的 RNA 作为模板，包括 Total RNA、poly(A)+RNA (mRNA)、病毒 RNA 等。

[4] 使用方法

1. 引物及 TaqMan® 探针的设计方法与性能验证

(1) 引物及 TaqMan® 探针的设计方法

为了获取高灵敏度和定量性的数据，引物及 TaqMan® 探针的设计至关重要。以下是设计时的一般注意事项：

(a) 引物

- 长度与组成：引物长度设定为 18~25bp，GC 含量控制在 40~60%，熔解温度 (T_m)* 为 60~65°C。
- 扩增产物大小：扩增片段建议设定在 70~200 bp 之间。超过 200 bp 可能会导致 PCR 效率下降，从而影响检测灵敏度。
- 特异性设计：通过设计跨不同外显子或位于外显子连接处的引物，可以避免来自基因组 DNA 的非特异性扩增。

(b) TaqMan® 探针

- 长度与组成：探针长度设定为 20~30bp，GC 含量控制在 40~60%，熔解温度 (T_m)* 为 65~70°C。
- 特异性设计：通过在外显子连接处设计 TaqMan® 探针，可以避免检测到来自基因组 DNA 的扩增产物。

* 推荐使用邻近数值法 (Nearest Neighbor method) 来计算引物及 TaqMan® 探针的熔解温度 (T_m 值)。本使用说明书中列出的引物及 TaqMan® 探针的 T_m 值是基于 Na⁺ 浓度为 50 mM，引物及 TaqMan® 探针浓度为 0.5 μM 的计算值。

本公司已基于邻近数值法 (Nearest Neighbor method) 公开了 T_m 计算公式。您可通过访问本公司网站下载并使用该程序：

<http://www.bio-toyobo.cn/file/tmcal.html>

如有其他疑问或需要进一步的帮助，请随时联系我们：

[Tel: 021-28894900; Email: tech@bio-toyobo.cn]

(2) 引物及 TaqMan® 探针的性能验证

引物及 TaqMan® 探针的性能可用以下方法确认，建议在开始实验前验证。

(a) 配制模板 RNA 的三级以上稀释梯度，并加入反应液中。

(例如：配制浓度分别为 0.2 ng/μL、2 ng/μL、20 ng/μL 的 Total RNA 稀释梯度，然后向 20 μL 反应体系中分别加入 5 μL 模板。)

(b) 制作标准曲线，确认 PCR 效率在 85~115% 之间，R² 值达到 0.98 及以上。如果 PCR 效率或 R² 值超出此范围，请调整延伸（退火）温度和时间，并优化引物及 TaqMan[®] 探针的浓度。如果调整后仍未改善，请重新设计引物及 TaqMan[®] 探针。

2. 反应液的制备

以下分别为 50 μL 及 20 μL 反应体系的配制示例。请根据所使用的 Realtime PCR 仪器的特性，适当调整反应液量的增减。

option

在同时检测多个基因时，可以使用相同的条件。但请务必事先在单独的反应中验证引物和 TaqMan[®] 探针组合的性能，并确认所选择的报告基团与 Realtime PCR 设备兼容。

如有其他疑问或需要进一步的协助，请随时与我们联系：

[Tel: 021-28894900; Email: tech@bio-toyobo.cn]

试剂	20μL反应	50μL反应	最终浓度
RNase free water	XμL	XμL	
THUNDERBIRD [®] Next Probe One-step qRT-PCR 4× Mix	5μL	12.5μL	1×
Forward Primer	10pmol	25pmol	0.5μM* ¹
Reverse Primer	10pmol	25pmol	0.5μM* ¹
TaqMan [®] Probe	4pmol	10pmol	0.2μM* ²
50× ROX Reference dye (Uracil-N-Glycosylase)	0.4 / 0.04μL* ³	1/0.1μL* ³	1× / 0.1×* ³
RNA溶液	YμL* ¹	YμL* ¹	
合计液量	20μL	50μL	

*¹ 如果在 0.5μM 浓度下未获得理想结果，请考虑将浓度调整至 0.2μM 至 0.5μM 范围内。

*² 如果在 0.2μM 浓度下未获得理想结果，请考虑将浓度调整至 0.2μM 至 0.4μM 范围内。

*³ 在 Applied Biosystems[®]和 Agilent Technologies 等设备中，为了校正孔间的荧光强度及分液误差，会使用 ROX 校正染料。在这些设备进行反应时，请添加 ROX Reference dye。最佳添加量因设备型号而异，主要设备的添加量见表 1。此外，对于不需要进行校正的设备，则无需添加。

*4 如果需要进行 Uracil-N-Glycosylase (UNG) 处理, 请使用热敏型(heat-labile)UNG。可另行购买 Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile (Code No. UNG-101)。

表 1. 主流设备的最佳 ROX Reference dye 浓度

机器	终浓度 (添加量)
Applied Biosystems® 7000、7300、7700、7900HT、StepOne™、StepOnePlus™ 等	1 × (1/50 量)
Applied Biosystems® 7500、7500Fast、QuantStudio®、Agilent Technologies 仪器 (option) 等	0.1 × (1/500 量)
Roche 仪器、Bio-Rad 仪器, QIAGEN 等	不需要

3. 循环条件设定

推荐使用以下正常或快速循环条件。请将荧光采集步骤设定在延伸(退火)阶段。多个目的基因同时检测时, 推荐按以下条件进行。

正常循环条件

Step	温度	时间
逆转录反应	50°C	10 分
预变性	95°C	1 分
PCR (40~45cycles) *1	变性	95°C
	延伸(退火)	60°C

高速循环条件

Step	温度	时间
逆转录反应	50°C	10 分
预变性	95°C	30 秒
PCR (40~45cycles) *1	变性	95°C
	延伸(退火)	60°C

*1 循环数请设定为 40, 扩增不充分时请提高到 45 个循环。

[5] 冻干 PCR · RT-PCR 制备指南

1. 冻干前 PCR 和 RT-PCR 试剂制备示例

进行冻干前请先制备 20 μ L 的反应溶液。

试剂	20 μ L反应	最终浓度
RNase free water	X μ L	
THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4 \times Mix	5 μ L	1 \times
Forward Primer	10pmol	0.5 μ M
Reverse Primer	10pmol	0.5 μ M
TaqMan® Probe	4pmol	0.2 μ M
合计液量	20 μ L	

引物添加最终浓度为 0.2~0.6 μ M，TaqMan®探针最终浓度为 0.05~0.3 μ M，可根据此标准适当调整。如果扩增效率不佳，增加添加量可能会有改善。相反，添加过多可能会导致非特异性反应，降低检测灵敏度。

2. 冻干机中的冻干程序

以下为使用【共和真空技术有限公司】（日本）的真空冻干机（冻干仪器）Triomaster II 时的冻干循环条件设置示例。有关详情，请参阅各自的使用说明书。

冻干循环示例

Step	Temperature	Time	Pa	Description
Freezing	-45° C	240 min		Hold
Primary Drying	-40° C	5.0° C /60min	20.0	Ramp
	-40° C	600 min	20.0	Hold
Secondary Drying	+20° C	1.0° C /min	2.0	Ramp
	+20° C	360 min	2.0	Hold

冻干条件会因冻干试剂的量及所使用的冻干设备等因素而有所不同。上述条件仅供参考，建议根据客户的实际操作条件进行优化。

冻干后的试剂易吸湿，请在有干燥剂的条件下保存。使用冻干产品时，请将冻干品用含模板 DNA 或 RNA 的 20 μ L 溶液充分溶解并混匀后，再置于热循环仪中。反应循环条件请参阅[4]方法 3. 的循环条件设定。

[6] 实验案例

实验示例：冻干前后 RNA 的检测

<方法>

使用 THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4× Mix, 尝试在冻干前后检测甲型流感病毒 (Influenza A 型) RNA。首先, 配制 20 μL 的反应液后进行冻干处理, 并将冻干后的试剂重新溶解。同时, 作为对照, 配制冻干前的反应液。将甲型流感病毒 RNA 按 4 倍稀释 (共 5 个稀释梯度), 并添加至 20 μL 反应体系中, 使其最终浓度为 $1.5 \times 10^3 \sim 5.9$ copies/反应。

1. 制备反应液

试剂	20μL体系	终浓度
RNase free water	XμL	
THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4× Mix	5μL	1×
Forward Primer	10pmol	0.5μM
Reverse Primer	10pmol	0.5μM
TaqMan® Probe	4pmol	0.2μM
共计	20μL	

2. 引物 probe 序列信息

Influenza A 型	序列 (5' - 3')
Forward Primer	CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA
Reverse Primer	GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA
TaqMan® Probe	[FITC (6FAM)]- TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG -[BHQ1]

3. 冻干条件

Step	Temperature	Time	Pa	Description
Freezing	-45° C	240 min		Hold
Primary Drying	-40° C	5.0° C /60min	20.0	Ramp
	-40° C	600 min	20.0	Hold
Secondary Drying	+20° C	1.0° C /min	2.0	Ramp
	+20° C	360 min	2.0	Hold

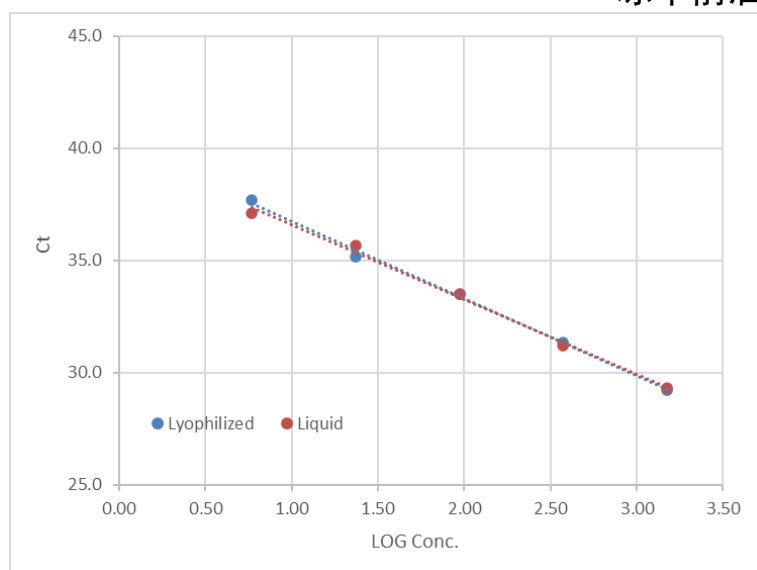
4. 循环条件 (CFX96 Touch Deep Well Realtime PCR 分析系统)

Step	温度	时间
逆转录反应	50° C	10 分
预变性	95° C	30 秒
PCR (40 cycles)	变性	95° C
	延伸(退火)	60° C

<结果>

在 $1.5 \times 10^3 \sim 5.9$ copies/反应范围内检测甲型流感病毒 RNA 时, 对比冻干前后的结果显示, 二者在检测灵敏度上无显著差异, 且 PCR 效率及 R^2 值均无差异。本产品冻干前后均能稳定检测到极低浓度的 5.9 copies RNA, 证实冻干过程对检测结果无不利影响。

冻干前后的反应性评估



	Lyophilized	Liquid
PCR 效率	95.0%	99.4%
R^2	0.99	0.99

[7] 常见问题

PCR 效率低、检测灵敏度低、检测结果杂乱

(1) 仪器的设定不合理

原因	对策
检测仪器的通道设定与荧光基团不符合	根据用于标记的荧光基团种类的不同，有必要改变检测仪器的设定。设定正确后再重新分析。
荧光采集的设定不合适	分析法不同，荧光采集的推荐设置位置也不同。确认设置，正确之后再进行分析。
样品位置的设定错误	请确认输入的样品编号与放入仪器的样品的位置一致，先设定正确的样品位置，再进行分析或实验。
其他的仪器故障·不良状态	请根据各仪器的使用说明书进行检查。

(2) RNA 样品不佳

原因	对策
RNA发生降解	由于RNase的作用，有可能引起模板RNA的降解。请重新修正RNA的抽提过程，使用RNA操作专用的移液器等器材，重新进行RNA的制备。

(3) ROX 浓度不合适

原因	对策
50×ROX Reference dye的浓度不合适	50×ROX Reference dye的最适添加量因仪器种类不同而异。另外，不需要校正的仪器则无需添加。请确认50×ROX Reference dye合适的浓度。

(4) 循环条件

原因	对策
延伸(退火)温度·时间不合适	变性和延伸(退火)的温度和时间必须根据说明书进行优化。关于反应循环,请查看说明书中的 [4] 3. 循环条件设置。

定量值的误差

(1) 仪器设定的不合适

原因	对策
仪器故障・不良状态	仪器发生故障时，可能会给使温度控制不佳或检测产生误差。请根据仪器的使用说明书定期进行检查。

(2) RNA 样品不好

原因	对策
样品纯度低	样品中的杂质可能是误差产生的原因。请使用纯度高的样品。另外，样品中的基因组 DNA 的残留，会导致检测到基因 DNA 来源的扩增产物。这种情况下，请参考「[4]使用方法 1. 引物及 TaqMan® 探针的设计方法与性能的确证」，重新设计引物及 TaqMan® 探针。此外，请将样品用 DNase I 处理，除去基因组 DNA。
样品的吸附	有可能 RNA 样品被微量管吸附。请使用低吸附管，重新制备 RNA。
模板 RNA 的拷贝数过少或过多	请制备模板 RNA 的 3 个梯度以上的稀释系列，制作标准曲线，在标准曲线的直线区域进行定量。

(3) 反应液量不合适

原因	对策
试剂分装的误差	尽管多数的荧光定量PCR仪器能够检测出比推荐的反应范围更少的反应液量，但有可能引起检测灵敏度及准确性降低。请提高反应范围，用推荐的反应液体积重新进行实验。
没有准确的加入 THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4×Mix	如果粘度较高，难以操作，可在移液前将其放置至室温。如果移液仍有困难，可稀释一次至 2 倍后再使用。

3. 阴性样品中检测到信号

原因	对策
假阳性或PCR产物的污染	首先, 请更换阴性样品。更换后仍然发生这种情况时, 请更换使用的灭菌水, 引物及试剂等, 再进行实验。
TaqMan® Probe的设计有问题	TaqMan® Probe有可能发生非特异性的结合。通过重新设计TaqMan® Probe, 有时可以得到改善。

[8] 相关产品

预防 Carryover · 假阳性 相关试剂

产品名称	内容	Code No.
热敏型 (Heat-labile) UNG Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile	200 U	UNG-101
不含甘油的热敏型 (Heat-labile) UNG Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile<Glycerol Free>	200 U	UNG-201

1-step Realtime PCR 相关试剂

产品名称	内容	Code No.
高效率 1-step qRT-PCR Kit THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit	250 次份/ 20µL 反应	QRZ-101



[制造 • 销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司
上海市浦东新区张杨路 500 号华润时代广场 28 层 AL 座
邮编：200122

交货期限 • 订货相关咨询

[Tel:021-5879-4900](tel:021-5879-4900) Fax:021-5879-4901
E-Mail:sales@bio-toyobo.cn

产品内容 • 技术相关咨询

Tel:021-5879-4142 Fax:021-5879-5259
E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>