

「qPCR」

| | |
|--|------|
| 第1章 目录 | 1-1 |
| → 按用途分类的产品流程图 | 1-2 |
| → 关于荧光定量 PCR | 1-4 |
| → 二代测序相关问题 | 1-7 |
| → qPCR | |
| THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit | 1-8 |
| <i>RNA-direct</i> ™ Realtime PCR Master Mix 系列 | 1-12 |
| KOD SYBR® qPCR Mix | 1-13 |
| THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR 系列 | 1-17 |
| THUNDERBIRD® qPCR 系列 | 1-19 |
| Realtime PCR Master Mix 系列 | 1-21 |
| → NGS 相关 | |
| GenNext® NGS Library Quantification Kit | 1-22 |
| GenNext® NGS Library Prep Kit | 1-24 |
| GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit | 1-26 |

INDEX

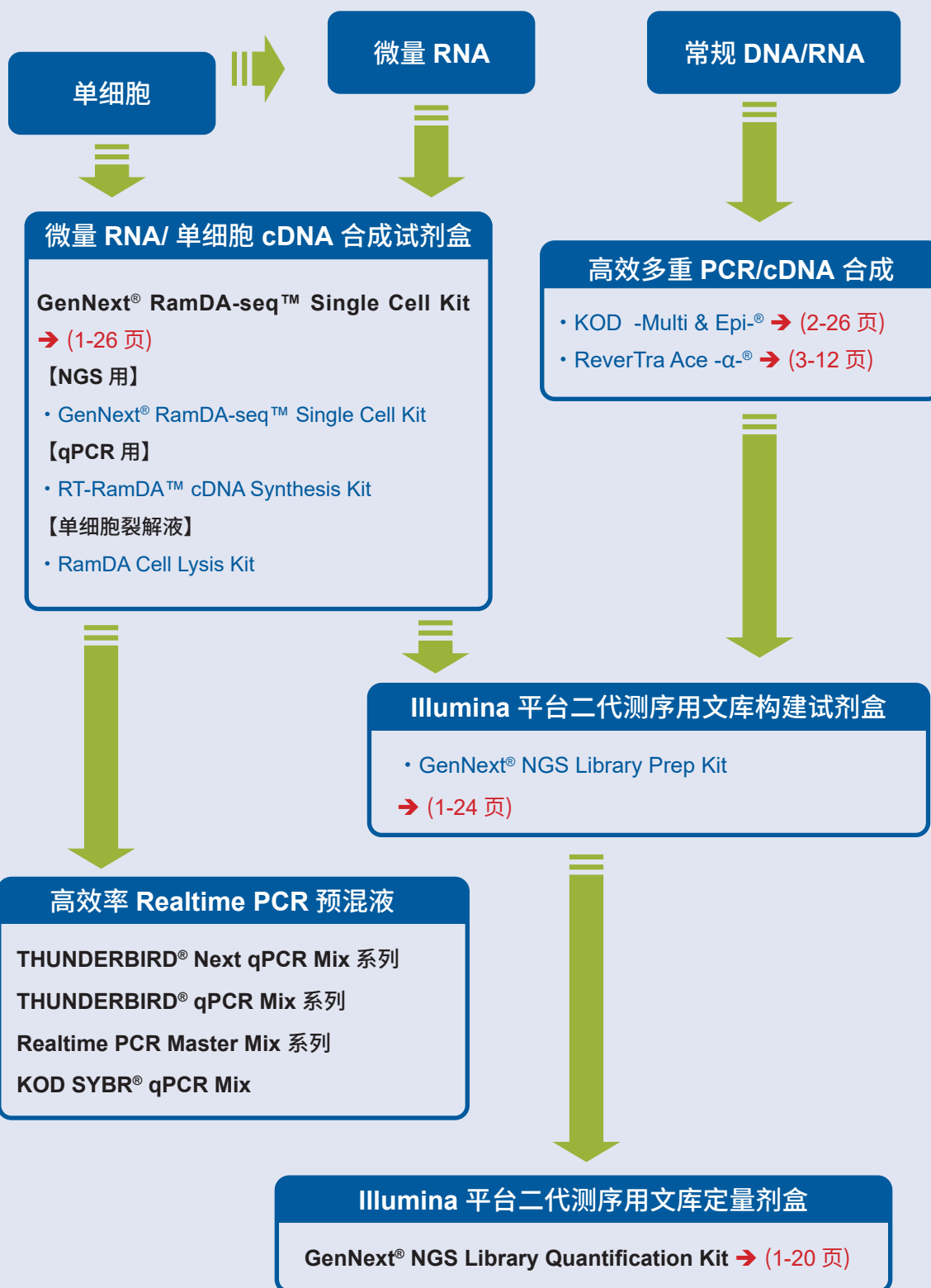
{ 按用途分类的产品流程图 }

荧光定量PCR



「NGS」

{ 按用途分类的产品流程图 }



1. 关于荧光定量 PCR 的检测方法

(1) 各种检测方法

Realtime PCR检测方法，通常有使用SYBR® Green I等染料的掺入法与使用TaqMan® 探针的探针法两种。两种方法各有其特长，因此根据用途选择方法很重要。

掺入法以荧光染料强度的大小为指标来检测DNA的扩增。由于该方法非常简便，因此想迅速进行实验，且要控制实验成本时，可考虑该方法。但用该方法通常会检测出引物二聚体等实验目的之外的扩增产物，因此必须注意特异性。用该方法时，一般要在扩增后进行融解曲线分析。DNA片段由于序列、长度不同而导致Tm值有差异，通过融解曲线分析能确认目的基因是否被特异性扩增(图1)。确认到非特异性扩增时，需重新探讨引物、循环、反应条件等。或者可考虑使用能提高特异性的Realtime PCR试剂「THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix」，「SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-」。

另一方面，TaqMan®探针法是通过特异性标记探针来检测扩增产物的方法。虽然探针的设计非常花工夫，但由于其能表现出优良的特异性，因此无需再进行融解曲线分析确认等。

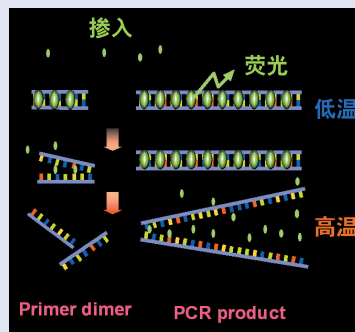


图1 掺入法检测融解曲线测定的原理

(2) 2-step法与1-step法

进行检测分析时，一般通常以RNA为模板合成cDNA，然后取一部分进行Realtime PCR。该方法被称为2-step法。另一方面，使用具有逆转录活性的Tth DNA polymerase(以下简称Tth)等将cDNA合成与PCR在同一离心管内进行的方法称为1-step法。

2-step法的优点在于，只要取一部分合成的cDNA进行分析，因此可以进行多次检测。因此，需要对很多基因的检测进行比较，或者想要留下一些由贵重的样品合成的cDNA时，可使用该方法。而1-step法适用于2、3个基因同时分析的高通量检测。本公司提供使用Tth的1-step分析用Realtime PCR试剂。

表1 荧光定量PCR相关试剂

| 2-step试剂 | | | |
|----------|---------|--|-------|
| cDNA合成 | FSQ-101 | ReverTra Ace® qPCR RT Kit | 3-10页 |
| cDNA合成 | FSQ-201 | ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix | 3-8页 |
| cDNA合成 | FSQ-301 | ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix With gDNA remover | 3-8页 |
| 探针法 | QPS-101 | THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix | 1-19页 |
| 探针法 | QPK-101 | Realtime PCR Master Mix | 1-21页 |
| 探针法 | QPX-101 | THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix | 1-17页 |
| 掺入法 | QKD-201 | KOD SYBR® qPCR Mix | 1-13页 |
| 掺入法 | QPS-201 | THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix | 1-19页 |
| 掺入法 | QPK-201 | SYBR® Green Realtime PCR Master Mix | 1-21页 |
| 掺入法 | QPK-212 | SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus- | 1-21页 |
| 掺入法 | QPX-201 | THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix | 1-17页 |
| 1-step试剂 | | | |
| 探针法 | QRZ-101 | THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit | 1-8页 |
| 探针法 | QRT-101 | RNA-direct Realtime PCR Master Mix | 1-12页 |
| 掺入法 | QRT-201 | RNA-direct SYBR® Green Realtime PCR Master Mix | 1-12页 |

2. 引物设计方法

Realtime PCR用引物一般设计为在目的基因50~180bp的区域进行扩增。引物的长度最好在20mer左右。不理想的引物设计一般有：①F,R引物的3'末端相互补、②引物3'末端附近GC含量较高、③引物内含有相互补的序列。

按如图2所示设计引物，用Taq DNA polymerase进行探讨，结果如图3所示。

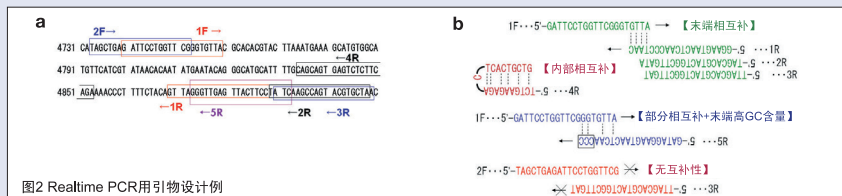


图2 Realtime PCR用引物设计例

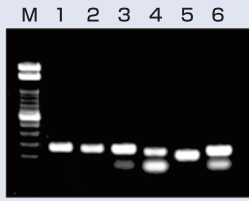


图3 引物序列和引物二聚体的关系

- M: 100bp Ladder marker
- 1: 2F-3R (无互补性)
- 2: 1F-3R (末端1个碱基相互补)
- 3: 1F-2R (末端2个碱基相互补)
- 4: 1F-1R (末端4个碱基相互补)
- 5: 1F-4R (内部相互补)
- 6: 1F-5R (部分相互补+末端高GC含量)

从探讨的结果来看，3'末端有2个碱基以上相互补的引物对，以及3'末端部分相互补且GC含量较高的引物对容易产生引物二聚体。

与此相反，末端只有1个碱基相互补的组合，内部有相互补区域的引物则不会产生引物二聚体。但也有实验指导手册指出，末端只有1个碱基相互补，内部有相互补区域的引物并不理想，而当只能设计这样的引物的时候，建议多进行几组引物设计，最好预先试一下。另外，虽然也可用引物设计软件进行设计，但通常情况下，不进行实际扩增实验并不能知道结果，因此最好对设计好的引物组合摸索条件。

3. 相对定量的方法

从理论上讲，由于PCR产物是成倍增加的，因此检测量可以用Ct值的乘方来定量，但实际上并非如此。这是因为由于引物的序列、扩增区域等的不同，有的容易扩增，有的不容易扩增。因此，在Realtime PCR分析中，经常取每种样品按一定的倍数稀释（如10倍稀释样品、5倍稀释样品），作为对照用样品作出标准曲线，以此作为标准，来计算并比较各自的检测量。对照样品可不要求绝对拷贝数、对含有各种基因的细胞、组织中抽提的RNA进行梯度稀释后均可以使用。

然而，作为样品的Total RNA、Poly (A)⁺ RNA等由于来自杂质，利用吸光度的RNA浓度的检测会有误差。而且，即便RNA的量可以准确定量，各个样品各自多少细胞也不尽相同，不能直接比较得到定量值。因此，一般情况下，用β-actin、G3PDH等内参基因的定量值对目的基因的定量值进行校正后才能进行比较。图4为使用内参的相对定量示意图。

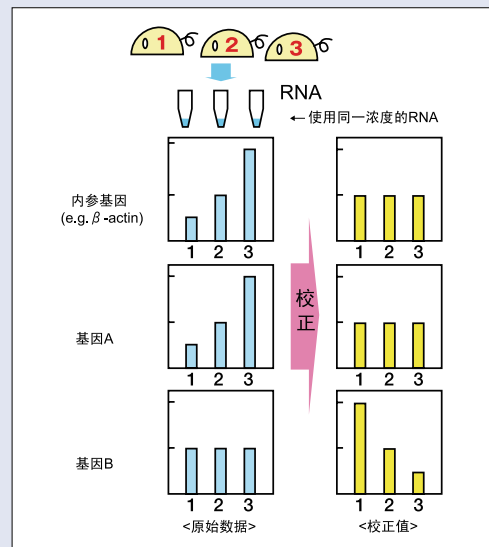


图4 内参的相对定量示意图

图5为以β-actin为内参基因，来相对定量从各器官检测出的Transferrin receptor基因量的计算例。

该方法用Excel表来计算非常方便。

一般把各基因标准曲线得到的定量结果导入到表中，然后除以内参值再校正。

| Subject | β-actin | | | Transferrin Receptor | | | 校正结果 | 相对量 | |
|----------------|-----------------|-------|--------|----------------------|-------|--------|-------|-------|------|
| | Ct | 计算值 | 定量结果 | Ct | 计算值 | 定量结果 | | | |
| RNA样品 | Heart (20ng) | 20.00 | 0.475 | 2.99 | 25.52 | 0.538 | 3.45 | 1.155 | 1 |
| | Brain (20ng) | 17.12 | 1.276 | 18.89 | 24.44 | 0.851 | 7.10 | 0.376 | 0.33 |
| | Placenta (20ng) | 17.37 | 1.207 | 16.10 | 23.54 | 1.113 | 12.96 | 0.805 | 0.7 |
| | Liver (20ng) | 18.99 | 0.756 | 5.70 | 28.58 | -0.350 | 0.45 | 0.078 | 0.07 |
| | Muscle (20ng) | 19.62 | 0.581 | 3.81 | 23.85 | 1.020 | 10.46 | 2.747 | 2.38 |
| Standard用RNA样品 | 2 (100ng) | | 14.73 | | | 20.55 | | | |
| | 1.301 (20ng) | | 16.74 | | | 22.76 | | | |
| | 0.602 (4ng) | | 19.49 | | | 25.36 | | | |
| | -0.097 (0.8ng) | | 22.19 | | | 27.71 | | | |
| 标准曲线 | 斜率(a) | | -3.595 | | | -3.445 | | | |
| | 截距(b) | | 21.708 | | | 27.373 | | | |
| | 相关系数 | | 0.995 | | | 0.999 | | | |

图5 相对定量的计算方法

4. 用普通的荧光定量 PCR 难以检测的目的片段及样品的解决方法

难扩增序列（高GC含量序列，易形成二级结构的序列），长链目的片段及粗样品的扩增等，用普通的荧光定量PCR试剂有时会难以检测，其原因之一是普通的荧光定量PCR试剂使用了Taq DNA polymerase。

Taq DNA polymerase是一种通用性很高，被广泛使用的PCR酶。然而，对于以上列举的目的片段和样品等不适用。

另一方面，KOD DNA polymerase虽然通用性低，但是通过优化处理，则非常适用于上述用途。我司研发人员通过敲除3'→5'核酸外切酶活性（影响通用性的主要原因之一），对KOD exo(-) DNA polymerase进行了优化处理，开发了[KOD SYBR® qPCR Mix](1-13页)。该荧光定量PCR试剂与以往使用Taq DNA polymerase的荧光定量PCR试剂相比具有以下特征。

KOD SYBR® qPCR Mix利用了KOD DNA Polymerase酶的特性（高效率、不易受粗样品所含抑制剂的影响），提高了SYBR® Green I分析的便利性及通用性，具有如右表所示的不同特性。

利用这些性质，可应用于各种用途。

作为难扩增序列的应用例，以启动子周边序列扩增为例。近年来通过ChIP(染色质免疫沉淀法)，采用荧光定量PCR法分析转录调节因子的结合序列的方法被频繁地使用。

然而，这些序列容易形成二级结构，GC含量高及含有重复序列的情况比较多，用普通的荧光定量PCR试剂往往就不能进行定量分析，而用本试剂则可进行有效且定量的检测。

与以往试剂的比较

| | 以往产品（使用Taq） | KOD SYBR® qPCR Mix |
|-----------|--------------------|------------------------------------|
| 酶 | Taq DNA Polymerase | KOD DNA Polymerase [exo(-) mutant] |
| 扩增长度 | 70 ~ 300 bp | 70 ~ 2000 bp |
| 高GC含量目的片段 | 难扩增 | 易扩增 |
| 抑制剂的影响 | 易受影响（需纯化DNA） | 不易受影响（可直接扩增粗样品） |

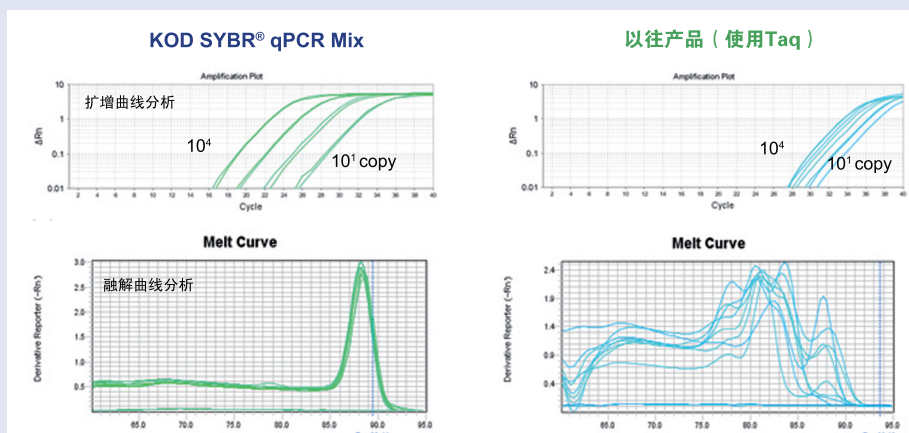
```

CCCGCCGAGAGAGTGACTCTCACGAGAGCGCGAGAGTCAGCTTGGCCAATCCGTG
CGGTCGGCGGCCGCTCCCTTTATAAGCCGACTCGCCCGCAGCGCACCGGGTTCGGG
AGGGTGGGCCTGGGAGGGGTGGTGGCCATTTTTGTCTAACCTAACTGAGAAGGGC
GTAGGCGCCGTGCTTTTCTCCCGCGCGGCTGTTTTCTCGCTGACTT
    
```

目的序列（GC含量：64%、219bp）：Homo sapiens telomerase RNA (TR) gene, promoter and complete sequence

模板：人基因组DNA

引物（引自ChIP法的论文）：使用上述用**红色**表示的序列。



NGS 简介

基因测序技术通过在分子水平解读生物遗传信息，为解答基础研究、农业、环境、医学健康等领域最具挑战性的问题提供帮助。第二代测序（Next Generation Sequencing）因其高通量、低成本的特点，应用前景广泛，大致包括基因组测序、转录组测序、外显子测序、靶向测序等。虽然种类繁多，上机前的主要流程大致可分为以下几个步骤：



1) 样本前处理

与下一代单分子测序技术不同，NGS 测序仪可接受的文库形态比较固定，一般为较短的 DNA 片段，并且两端有固定的接头序列。相比之下，起始样本的种类要丰富得多，可以是实际样本中分离纯化的 DNA/RNA，也可以是探针捕获序列或 PCR 产物等。对于平均长度较短的样本，可直接用于文库构建，而序列较长的模板则需要提前打断成合适大小的片段。

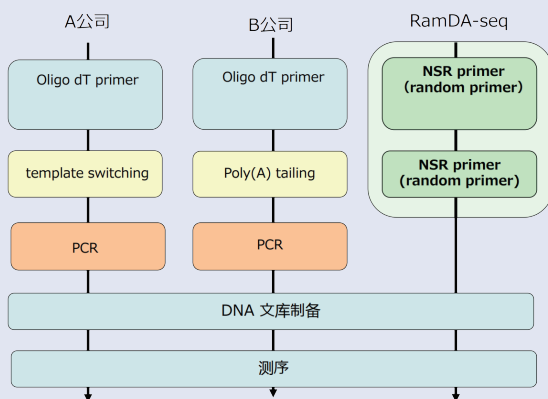
多重 PCR 是样品前处理的重要方式，常见于 SNP 检测、靶向测序等的序列扩增环节。专用的 KOD -Multi & Epi-® 高保真 PCR 聚合酶能保证各靶序列均一扩增，从源头保证测序的准确性。

对于 RNA 样本，第一步需要通过逆转录酶转化为 cDNA，传统的转录组测序方法难以保证全长覆盖的均一性，在以单细胞或微量 RNA 为样本时尤为突出。GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 借助 RT-RamDA 全转录组扩增技术，可以实现从 RNA 直接扩增出足量的 cDNA，再结合优化后的 NSR 引物有效抑制 rRNA 的扩增，得到的 cDNA 可进行高质量的文库构建。相比传统使用 Oligo dT 为逆转录引物的技术，RT-RamDA 无需 PCR 即可实现 10 倍以上的 cDNA 得率，同时将偏差降到最低，对于较长的 RNA 片段保持与常规转录本一致的测序成功率。

2) DNA 文库制备

以 Illumina 平台为例，前处理后的样品大致需要经过补齐末端、加 'A'、连接测序接头 (Adapter) 等步骤以构建文库。由于涉及的反应较多，以往试剂盒包含的试剂种类繁多，操作步骤冗长，建库效率较低，GenNext® NGS Library Prep Kit 整合了末端修复和加 'A' 过程，精简组分的同时缩短了操作时间，文库得率也大大提高。

针对低起始量的文库，有必要通过 PCR 增加文库产量，由此可能造成的扩增偏差会直接影响最终的测序结果。此外，在连接测序接头以及 PCR 扩增之后通常需要使用磁珠进行产物纯化，一方面降低体系对下游实验的影响，另一方面也对片段大小进行筛选。

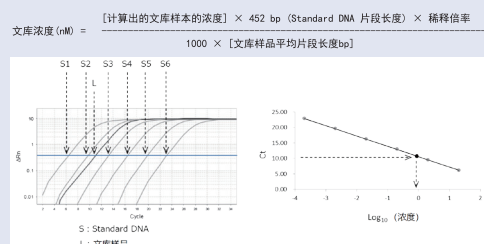


RNA 建库技术的比较

3) 文库上机前定量

文库上机过高或过低都有可能致测序失败，因此上机前进行准确定量很重要，实时荧光定量 PCR 是应用较为广泛的方法之一。主要原理是，以测序接头上特异的 P5、P7 序列为引物，通过已知浓度的系列标准品对待测文库进行绝对定量，从而精确计算出有效片段的浓度，也即排除了两端测序接头不完整的 DNA 片段。该方法结果精确，重复性好，很适合高通量操作。

定量前需要对文库按恰当的比例进行稀释，得到标准曲线和待测样品的 Ct 值，然后根据公式计算出初始文库的 mole 浓度。我司产品 GenNext® NGS Library Quantification Kit 包含了定量引物及 6 个浓度的标准品，无需额外试剂即可完成定量操作。同时采用了高效率的 KOD SYBR® qPCR Mix，能够应对高 GC、长片段这种难扩增的序列，保证了定量结果的准确性和可重复性。



最适用于 RNA 病毒等迅速·高灵敏度的定量!

高效率 One Step qRT-PCR Kit

THUNDERBIRD® Probe One-Step qRT-PCR Kit

| | | |
|----------------|--------|--------|
| Code: QRZ-101S | 20次份* | ¥500 |
| Code: QRZ-101 | 100次份* | ¥2,400 |

本试剂盒是使用了高效逆转录酶 ReverTra Ace 和 PCR 酶 Tth DNA Polymerase 的 2 酶体系一步法荧光定量 PCR 试剂盒。主要用于使用 TaqMan® 分析法的荧光定量 PCR。



产品内容:

<QRZ-101>

| | |
|------------------------|--------------|
| 2×Reaction Buffer | 1.25ml × 2 支 |
| DNA Polymerase | 125 μl × 1 支 |
| RT Enzyme Mix | 125 μl × 1 支 |
| 50×ROX Reference dye** | 100 μl × 1 支 |
| RNase free Water | 1.25ml × 2 支 |

*表示的是 50 μl 反应体系时的使用次数。

**ROX 溶液另外添附, 可以适用于所有市售的荧光定量 PCR 仪。

保存:

-20°C

备注:

LightCycler® 是 Idaho Technology Inc. 的商标。

TaqMan® 是 Roche Molecular Systems Inc. 的注册商标。

→ 特征

① 迅速·高灵敏度

通过使用 TaqMan® 探针一步法 qRT-PCR, 能够对微量 RNA 进行迅速、高灵敏度的检测。

② 降低了序列偏差性

不受目的基因序列影响, 可高灵敏度地检测各种 RNA, 把多重荧光检测中各目的片段扩增的偏差性抑制到最低。

③ 对 PCR 抑制物的抗性

能够降低血红素等 RNA 中混入杂质而引起的抑制作用。

④ 使用 dUTP

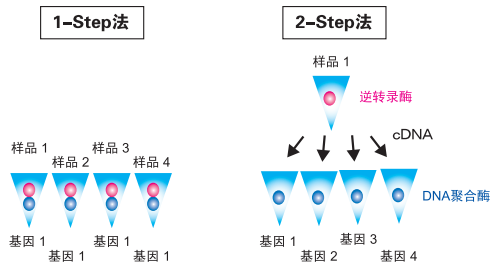
可通过添加 UNG, 防止因 carryover 污染导致的假阳性。

* 本试剂盒中不含 UNG。

→ 用途: 荧光定量 PCR

→ 说明

本试剂盒是使用了高效率逆转录酶 ReverTra Ace® 和 PCR 酶 Tth DNA Polymerase 的两酶一步法荧光定量 PCR 试剂盒。主要用于 TaqMan 分析法的荧光定量 PCR。



| | 1-Step法 | 2-Step法 |
|------|---|---|
| 优点 | <ul style="list-style-type: none"> 一次反应就能完成检测 → 样品数较多时比较有效 → 降低了污染的风险 | <ul style="list-style-type: none"> 可使用cDNA进行多个基因的检测 → 检测的基因数较多时比较有效 逆转录用的引物的选择较多 |
| 缺点 | <ul style="list-style-type: none"> reverse primer已被限定 难以最优化(容易出现偏差) 无法进行多重检测 | <ul style="list-style-type: none"> 操作烦杂 |
| 主要用途 | <ul style="list-style-type: none"> 病毒等的定量、筛选等 | <ul style="list-style-type: none"> mRNA的相对定量等 |

由于逆转录反应与 PCR 在同一反应体系中连续进行，反应液的分装操作只需一次即可完成，适用于高通量分析。

此外，还降低了样品间交叉污染的危险性。

本产品通过将两种酶与最优化的 buffer 相组合，可以对微量 RNA 进行迅速定量。适用于对 RNA 病毒及低表达量 mRNA 的定量。同时，不易受目的基因序列的影响，可高灵敏度地检出各种 RNA。

| 以往一步法的缺点 | 本试剂盒的改良点 |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ● 引物的优化比较困难【无法达到高灵敏度】 ● 容易产生因序列而导致的测定灵敏度偏差 | <ul style="list-style-type: none"> ● 将因引物、探针或目的片段序列而引起的扩增偏差性影响抑制到了最低限度 ▶ 适用于各种病毒及 mRNA 的迅速、高灵敏度检测/定量 |
| <ul style="list-style-type: none"> ● 容易因 RNA 中的杂质而导致灵敏度下降 | <ul style="list-style-type: none"> ● 可避免因杂质而引起的抑制 |
| <ul style="list-style-type: none"> ● 难以用 TaqMan® 探针法进行多重荧光分析 | <ul style="list-style-type: none"> ● 将多重检测中各目的片段扩增的偏差抑制在最低限度 ▶ 最适用于以管家基因作为对照的多基因的相对定量等 |

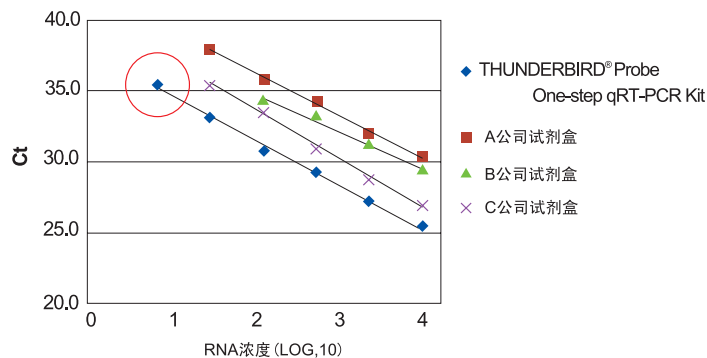
→ 结果示例

① 肠道病毒 RNA 的高灵敏度检测

将肠道病毒 RNA 作 4 倍稀释，使用 TaqMan® 探针法，与其他公司的产品进行检测灵敏度、定量性的比较。引物、TaqMan® 探针直接使用了论文记载的序列（未进行优化处理）。用 ABI 的 StepOne Plus™ 进行分析。

结果可见，只有在使用本试剂的情况下，才能检测出 10 个拷贝数以下的 RNA，因此可得到更广的可定量扩增区域。

因此，本试剂盒对 RNA 病毒及低表达量的 mRNA 检测·定量非常有效。



基本反应条件：

反应液组成

| 试剂 | 量 |
|---|----------|
| RNase free Water | X μl |
| 2× Reaction Buffer | 25 μl |
| DNA Polymerase | 1.25 μl |
| RT Enzyme Mix | 1.25 μl |
| Forward Primer | 25 pmol |
| Reverse Primer | 25 pmol |
| TaqMan® probe | 10 pmol |
| 50× ROX Reference dye (Uracil-N-Glycosylase 1Unit ^{*1}) | 1/0.1 μl |
| RNA 溶液 | Y μl |
| 总体积 | 50 μl |

*1 进行 Uracil-N-Glycosylase(UNG) 处理时，请使用热敏性 UNG(heat-labile)。可根据各公司推荐的条件，调整酶的用量。

Cycle

(20~25°C, 10min.*2)

50°C, 10min.

95°C, 1min.

95°C, 15sec.

60°C, 45sec. } 40~45 cycles

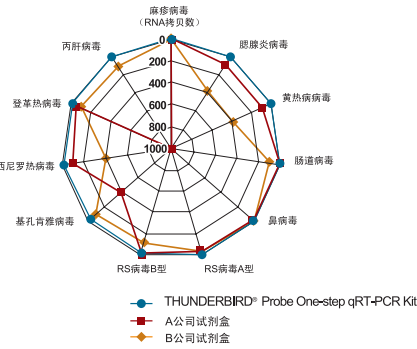
*2 进行 UNG 处理时，请在逆转录反应前设定 UNG 反应的步骤。上述表示的是通常的温度条件及反应时间，请根据各公司推荐的条件进行适当调整。

2 各种病毒检测灵敏度的比较

配制 11 种病毒 RNA 的 4 倍稀释系列溶液，使用 TaqMan® 探针法，进行最高检测灵敏度的比较。

引物、TaqMan® 探针直接使用论文记载。使用 ABI 的 StepOne Plus™ 进行检测。右图是将各试剂盒能检测到的最低拷贝数连线作成的。

结果显示，只有在用本试剂盒的情况下，才能对所有的目的基因 30 个拷贝以下的灵敏度进行检测及定量。本实验表明，本产品不受目的片段序列的影响，能高灵敏度地检测到各种 RNA。



3 多重荧光检测 (Multiplex) 体系中的表达定量

使用 3 种荧光染料标记的 TaqMan® 探针，分别进行单独检测及通过多重荧光检测体系一次性使用 3 种 TaqMan® 探针进行检测，分析 IL-1 β 、TNF- α 、GAPDH 基因的表达量。

实验中以 HeLa S3 RNA (1pg~100ng 的 10 倍稀释 [6 个梯度]) 为样品，用 Roche Diagnostics 公司的 LightCycler® 96 进行分析。

结果显示，各基因单独检测 (Singleplex) (图 1) 与使用 3 通道的多重荧光检测 (Multiplex) (图 2) 得到了相同的灵敏度，PCR 效率及相关系数并没有太大的差异 (表 1)。

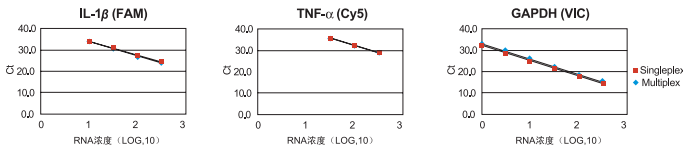


图1 单独检测 (Singleplex) 的结果
各目的基因单独检测的结果。为了与图2多重荧光检测 (Multiplex) 的结果相比较作成了图。

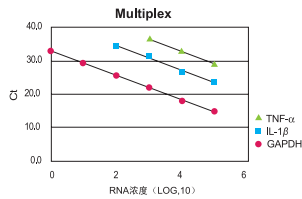


图2 多重荧光检测的结果

| | IL-1 β | | TNF- α | | GAPDH | |
|------------|--------------|----------------|---------------|----------------|-------|----------------|
| | PCR效率 | R ² | PCR效率 | R ² | PCR效率 | R ² |
| Multiplex | 90.2% | 0.989 | 91.8% | 0.999 | 89.6% | 0.999 |
| Singleplex | 91.6% | 0.999 | 92.9% | 0.998 | 91.6% | 0.999 |

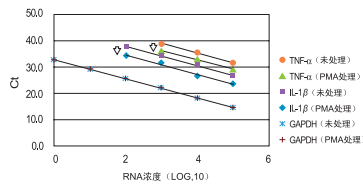


图3 通过多重荧光检测表达分析的结果

将HeLa S3细胞铺于6孔板中，每孔 4×10^5 个细胞，添加100nM的phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)，培养20小时。之后，使用分别从PMA处理及未处理的细胞中提取的Total RNA，用本试剂盒对IL-1 β 、TNF- α 、GAPDH基因的表达量进行分析。
结果显示，通过PMA处理，IL-1 β 、TNF- α 的表达量得到了提高。

4 使用临床检测样本的 RS 病毒 A 型、B 型的同时定量

使用从 20 个检测样本中的咽喉粘液中抽提的 RNA 样品，用 RT-PCR 法及使用 THUNDERBIRD® One-step qRT-PCR Kit 的 qRT-PCR 法进行 RS 病毒的检测。

另外，同时与用抗体检测方法进行分析的结果进行比较。

为了判别 RS 病毒的 A 型和 B 型，使用特异性引物及各种不同荧光标记的 TaqMan® 探针，用 qRT-PCR 进行定量分析。

分析使用了 Roche Diagnostics 公司的 LightCycler® 96。结果显示，在抗体检测法中判定为假阴性的检测体，用 PCR 法可以高相关性地判定有无感染，且类型判定结果完全一致。

表 使用各种方法的 RS 病毒的检测相关试验结果

| 检测样本编号 | 抗体检测方法 | PCR (定性、类型判定) | qPCR 分析的定量值 (拷贝数) | |
|--------|--------|---------------|--------------------|--------------------|
| | | | A 型检测 (FAM, 470nm) | B 型检测 (Cy5, 645nm) |
| 1 | + | +(A) | 1.6×10^5 | - |
| 2 | - | - | - | - |
| 3 | + | +(A) | 8.1×10^4 | - |
| 4 | + | +(A) | 2.7×10^5 | - |
| 5 | - | +(A) | 9.6×10^2 | - |
| 6 | - | +(A) | 3.6×10^3 | - |
| 7 | + | +(A) | 2.3×10^6 | - |
| 8 | - | - | - | - |
| 9 | + | +(A) | 1.5×10^5 | - |
| 10 | + | +(A) | 6.7×10^5 | - |
| 11 | - | - | - | - |
| 12 | + | +(A) | 1.6×10^5 | - |
| 13 | + | +(A) | 9.4×10^3 | - |
| 14 | - | +(A) | 9.5×10^3 | - |
| 15 | + | +(A) | 3.9×10^3 | - |
| 16 | + | +(A) | 2.4×10^5 | - |
| 17 | - | - | - | - |
| 18 | - | +(A) | 4.2×10^4 | - |
| 19 | - | +(A) | 3.4×10^2 | - |
| 20 | - | +(B) | - | 9.6×10^3 |

→ 相关产品

① 简便的掺入法 One-step Realtime PCR 用试剂

| | | | | |
|--|---------|-----------|--------|----------|
| RNA-direct SYBR® Realtime PCR Master Mix | QRT-201 | 0.5ml×5 支 | ¥2,000 | → 1-12 页 |
|--|---------|-----------|--------|----------|

② RNA 配制相关器具

| | | | | |
|---------------------------|----------|-------|--------|----------|
| Magical Trapper | MGS-101 | 1 个 | ¥1,000 | → 5-11 页 |
| MagExtractor™ -Viral RNA- | NPK-401F | 100 次 | ¥1,600 | → 5-8 页 |
| MagExtractor™ -RNA- | NPK-201F | 100 次 | ¥2,600 | → 5-6 页 |

单酶·一步法 迅速、高性能的 Realtime PCR 试剂盒。

One Step qRT-PCR Kit

RNA-direct Realtime PCR Master Mix 系列

RNA-direct Realtime PCR Master Mix

Code: QRT-101 0.5ml × 5支 ¥2,000

RNA-direct SYBR® Realtime PCR Master Mix

Code: QRT-201 0.5ml × 5支 ¥2,000

本酶是以 rTth DNA polymerase 为基础开发的单酶一步法 2 × Master Mix。直接以 RNA 为模板，可在单管中进行高效率的 Realtime PCR 分析。



产品内容:

<QRT-101, QRT-201>

| | |
|--|------------|
| Master Mix | 0.5ml × 5支 |
| 50mM Mn(OAc) ₂ | 0.5ml × 1支 |
| (50 μl 反应体系可用 100 次, 20 μl 反应体系可用 250 次) | |

保存:

-20°C (避光保存)

备注:

LightCycler® 是 Idaho Technology Inc. 的注册商标。
SYBR® 是 Molecular Probes Inc. 的注册商标。
TaqMan® 是 Roche Molecular Systems Inc. 的注册商标。
ABI PRISM® 是 Applied Biosystems Inc. 的注册商标。

网络版追加信息:

- 简要备注
- 实验例

基本反应条件:

<SYBR® Green I Assay>

| | |
|-------------------------------------|---------------|
| 使用 PRISM®7900HT(Applied Biosystems) | |
| 灭菌水 | X μl |
| Master Mix | 25 μl |
| 50mM Mn(OAc) ₂ | 2.5 μl |
| 各引物 | 10pmoles each |
| RNA 样品 | <1 μg |
| Total Volume | 50 μl |

| | |
|---------|--------|
| Cycle | |
| 90°C | 30sec. |
| 61°C | 20min. |
| | ↓ |
| 95°C | 60sec. |
| | ↓ |
| 95°C | 15sec. |
| 55~65°C | 15sec. |
| 74°C | 45sec. |

45cycles

※ 退火温度请根据引物的 T_m 值在 55~65°C 之间调整。

※ 扩增片段最大如在 200bp 左右, 则延伸反应的时间为 45sec. 也没有问题。

→ 特征

① 一步法·高通量

以 RNA 为模板, 可在单管中进行高效率的 Realtime PCR 分析, 快速方便, 非常适用于高通量反应。

② 高特异性

为了控制非特异性反应, 采用了中和抗体的热启动法。

③ 广泛的应用性

可用于 Probe Assay 和 SYBR® Green Assay 等方法。

④ 高通用性 (可用于各种仪器)

因产品中已添加了 Passive Reference, 因此可用于需要校正荧光信号的仪器 (如 Applied Biosystem 公司的 ABI PRISM® 7700 等)。

可应用于使用 Glass Capillary 分析体系的仪器 (如 Roche 公司的 LightCycler® 等)。

⑤ 可应用于易形成高级结构的 RNA 和高 GC 含量的目的片段

由于本试剂盒可以在高温下进行逆转录反应, 因此可以应用于易形成高级结构的模板 RNA。而且因为 Tth DNA Polymerase 对高 GC 含量的序列扩增有效, 因此也适用于对高 GC 含量目的片段的检测。

→ 用途: 荧光定量 PCR

→ 说明

由于 Tth DNA Polymerase 在 Mn²⁺ 存在的情况, 显示出独特的逆转录活性, 因此使用该酶可在同一离心管连续进行 cDNA 合成反应和 PCR。本试剂是利用该特性开发而成的「单酶·一步法」Realtime PCR 试剂, 与在同一反应体系内使用 RTase 和 Taq DNA Polymerase 的「双酶·一步法」系列试剂相比, 由于用单酶反应更容易设定最佳条件, 因此能进行高效率的分析。

最适用于融解曲线分析的多重 PCR。

高效率荧光定量 PCR Master Mix

KOD SYBR® qPCR Mix

KOD SYBR® qPCR Mix

| | | |
|----------------|-------------|---------|
| Code: QKD-201T | 1ml × 1支 | ¥ 500 |
| Code: QKD-201 | 1.67ml × 3支 | ¥ 2,450 |

KOD SYBR® qPCR Mix 是使用 KOD DNA polymerase(KOD) 的 SYBR® Green I 检测体系的荧光定量 PCR 用 Master Mix。通过将去除了 3'→5' 核酸外切酶活性 (校正活性) 的 KOD exo(-) DNA polymerase 与优化过的 buffer 相组合, 最大程度地发挥了 KOD 出色的合成性能和不易受粗样品成分抑制的特性, 可稳定地用于各种用途的荧光定量 PCR 检测分析。

→ 特征

① 适用于高 GC 含量的目的片段

用以往的产品难以扩增的 GC 含量超过 70% 的目的片段, 也能确认到一定量的扩增。

IGF2R (GC 含量: 83%、模板: cDNA)

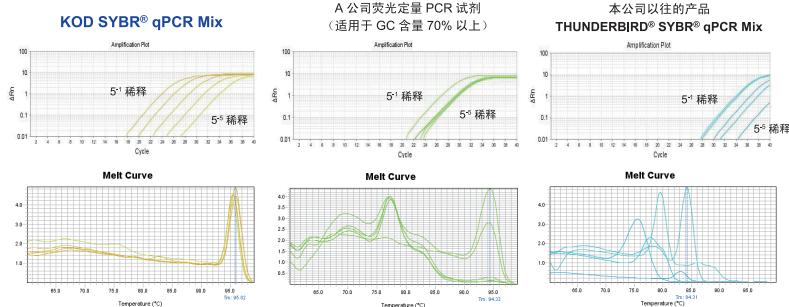


图 1. 针对于 GC-rich 目的片段的荧光定量 PCR (使用 ABI StepOne Plus™)

针对于 GC 含量超过 70% 的目的片段, 用各种荧光定量 PCR 试剂进行反应性能的比较。模板用了本公司高性能逆转录反应试剂 [ReverTra Ace® qPCR RT Kit(Code No.FSQ-101)] 合成的 HeLa 细胞 total RNA 来源的 cDNA, 对 cDNA 作 5 倍稀释 (5 个梯度) 进行反应。结果显示, 用本公司以往产品难以扩增的高 GC 含量的目的片段也可以得到一定量的扩增。另外, 由于其高特异性及不易产生引物二聚体的特性, 拷贝数较低时也能够进行定量, 因此可用于更广的可定量扩增区域。

Homo sapiens telomerase RNA(TR) gene 的启动子区域 (GC 含量: 64%、扩增长度: 219bp)

CCCGCCCGAGAGAGTGACTCTCACGAGAGCCGCGAGAGTCACTTGGCCATCCGTGCGGTGCGCGGCCGCTCCCTTATAAGCCGACTCGCCCGGAGCGCACCGGGTTGCGGAGGGTGGGAGGGGTGGTGGCCATTTTTGTCTAACCTAAGTGAAGGGCGTAGGCGCGTCTTTTCTCCCGCGCGCTGTTTTCTCGGTGACTT

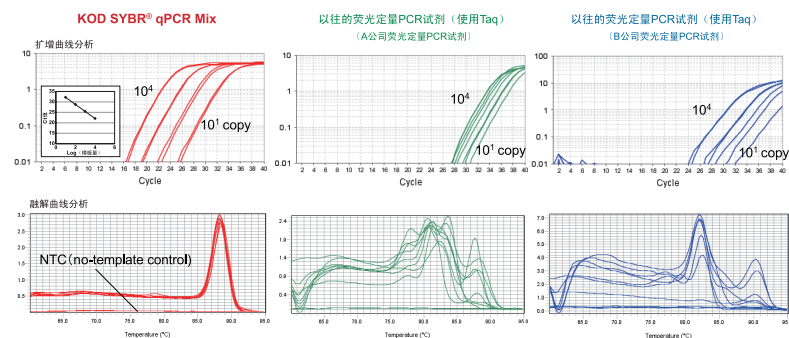


图 2. 针对于 GC 含量有偏差的启动子区域的荧光定量 PCR (使用 ABI StepOne Plus™) 已确认本试剂也适用于易形成二级结构的目的片段。

② 适用于长链目的片段 (~2kb)

针对于 KOD FX 及 KOD -Plus- 系列等一般 PCR 设计的引物可以直接使用。由于长链目的片段也可以扩增, 因此可极大地扩大引物的选择范围。

产品内容:

<QKD-201T>
qPCR Mix 1ml × 1支
50 × ROX reference dye 50 μl
(50 μl 反应体系可使用 40 次, 20 μl 反应体系可使用 100 次)

<QKD-201>
qPCR Mix 1.67ml × 3支
50 × ROX reference dye 250 μl
(50 μl 反应体系可使用 200 次, 20 μl 反应体系可使用 500 次)

保存:

-20°C (避光保存)

※ 在短时间 (3 个月以内) 使用完毕的情况下, 可在 2~8°C 避光保存。

参考文献:

- 1) R.M.de Breuil et al., *PCR Methods Appl.*, **3**:57-59 (1993)
- 2) P.M.Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:7276-7280. (1991)

备注:

LightCycler® 是 Idaho Technology Inc. 的注册商标。

SYBR® 是 Molecular Probes Inc. 的注册商标。

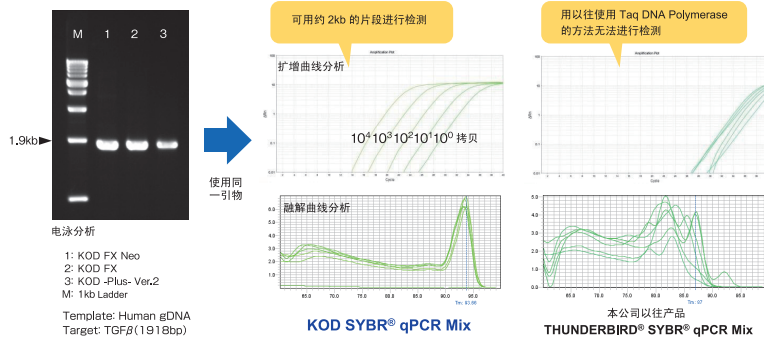


图 3. 针对长链目的片段的荧光定量 PCR (使用 ABI StepOne Plus™)

使用能够用 KOD FX 系列及 KOD -Plus- 系列扩增的引物, 对约 2kb 目的片段进行扩增。结果显示, 用以往使用 Taq DNA polymerase 的试剂难以扩增的约 2kb 的目的片段, 用本产品也可以进行定量的扩增。

由于能够选择长至 2kb 的各种长度的目的片段, 因此可以在很广的范围内进行融解曲线分析。因为可以避免产生引物二聚体的区域(短链区域)进行扩增, 所以在用 endpoint assay 法进行多态性分析及多重 PCR 分析方面非常有利。

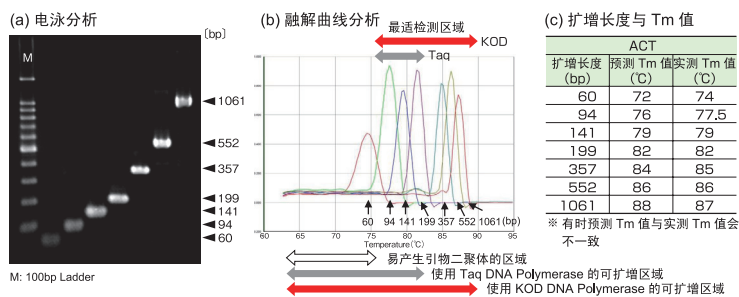


图 4. 使用扩增长度不同的目的片段进行分析 (使用 ABI 7500)

以人基因组 DNA 为模板对 β -actin 基因上不同长度的目的片段进行扩增, 并进行融解曲线分析。结果表明, 可得到从 60bp~ 约 1kb 范围内的扩增产物, 且在 74~87°C 的范围内可识别出本次扩增的 PCR 产物。因此, 就可通过设计引物来改变扩增片段长度使融解温度产生差异, 从而在单管中进行多目的片段检测成为可能。这种融解曲线的差异虽然会受 GC 含量的影响, 但是可以通过计算扩增产物的 Tm 值来进行预测。

3 可使用粗样品进行分析

可直接对植物裂解液、鼠尾碱裂解液、血液等粗样品进行检测。应用 SYBR® Green I 分析体系, 能够使复杂的多态性分析及 SNP 分析简单化。

① 使用扩增长度多态性进行基因分型

只需通过设计引物来改变 2 个扩增产物的长度, 从而使得 Tm 值产生差异, 就可在同一离心管里进行小鼠的基因分型 (参照前述特征)。

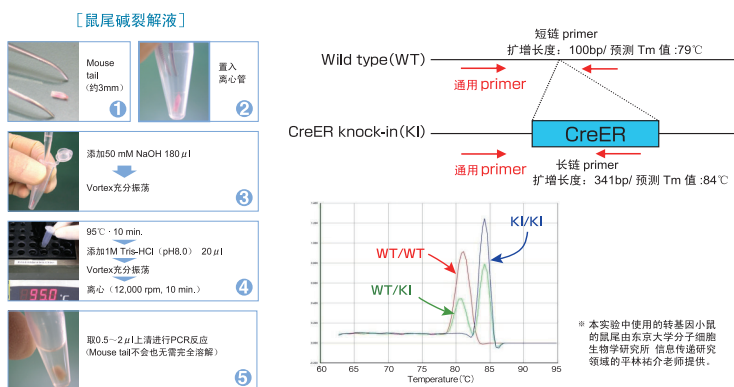


图 5. 应用融解曲线分析在单管中进行小鼠基因分型 (使用 ABI 7500)

使用鼠尾的碱裂解液在同一离心管中进行了基因分型。通过改变 WT 特异性扩增产物和 knock-in 特异性扩增产物的片段长度, 在计算上, 将引物设计为使扩增产物的 Tm 值产生差异。WT 特异性引物相对于 CreER knock-in, 因其扩增长度更长, 30 秒的延伸时间太短, 所以无法扩增。另外, 为了在杂合子检测中使各个基因型的峰值比例比较均衡, 可将 WT 特异性引物: knock-in 特异性引物 = 1:3, 检测结果显示, 所有种类均成功地进行了基因分型。

② 使用 ASP (Allele specific primer)-PCR 进行 SNP (Single nucleotide polymorphism) 分析
将一条引物的 5' 末端加上 GC tail, 就可以通过融解曲线分析法识别相同的基因, 可应用于各种原理的 ASP-PCR。如下所示, 从引物 3' 端开始, 将第二个碱基设计为 SNP 位点, 第三个碱基设计为错配位点, 进行分析。

基本反应条件:

< 掺入法 >

| | |
|------------------------|--------------|
| 灭菌水 | X µl |
| qPCR Mix | 10 µl |
| Forward Primer | 4 pmoles |
| Reverse Primer | 4 pmoles |
| 50 × ROX reference dye | 0.4/0.04 µl* |
| DNA 样品 | Y µl |
| Total Volume | 20 µl |

*50 × ROX reference dye, 是对于使用 Passive Reference 的仪器 (如 Applied Biosystems 公司制造的仪器等), 为校正各孔间的荧光强度及分注误差而使用。最适添加量根据仪器不同而不同。不用 Passive Reference 进行校正的仪器无需添加。

| | |
|----------|--------------|
| Cycle | |
| 98°C, | 120sec. |
| ↓ | |
| 98°C, | 10sec. |
| 60°C *1, | 10sec. |
| 68°C, | 30sec./500bp |

40cycles

*1 : 退火温度请设定在 50~68°C 范围之间。

※ 目的序列在 500bp 以下时延伸时间 30 秒就可以充分进行反应, 但是有一部分仪器在检测稳定的荧光时, 需要的时间要大于 30 秒。扩增曲线散乱或各孔的差异较大时, 请设定较长的延伸时间 (45~60 秒)。

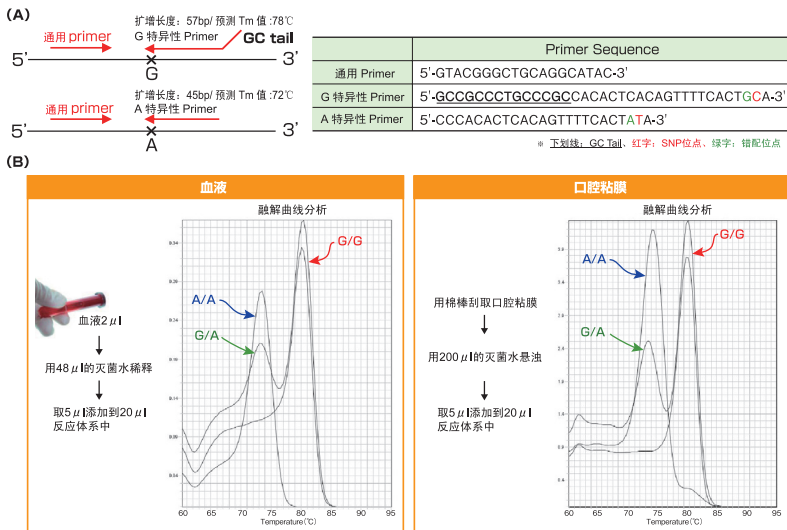


图 6. 血液及口腔粘膜的检测 (使用 ABI 7500 Fast)

(A) 所示的是用于 ALDH2 SNP 检测的引物。为了能在同一离心管中识别出基因型，引物设计时，在一边等位基因特异性引物上加上了 GC tail(下划线部分)，使扩增产物的融解温度 (Tm 值) 产生差异。为了通过添加 GC tail 使得融解温度大幅上升，可将扩增片段长度设计为 100bp 以下。另外，在本实验中，将等位基因特异性引物从 3' 末端开始的第二个碱基设计为 SNP 位点 (红色)，第三个碱基设计为错配位点 (绿色)。

(B) 分别取 5 μl 血液的水稀释液及口腔粘膜的悬浊液添加到 20 μl 反应体系中进行检测。其结果可判断基因型。

③粗样品中目的片段的扩增

用以往使用 Taq DNA polymerase 的荧光定量 PCR 试剂难以扩增的粗样品也可以本试剂进行分析。

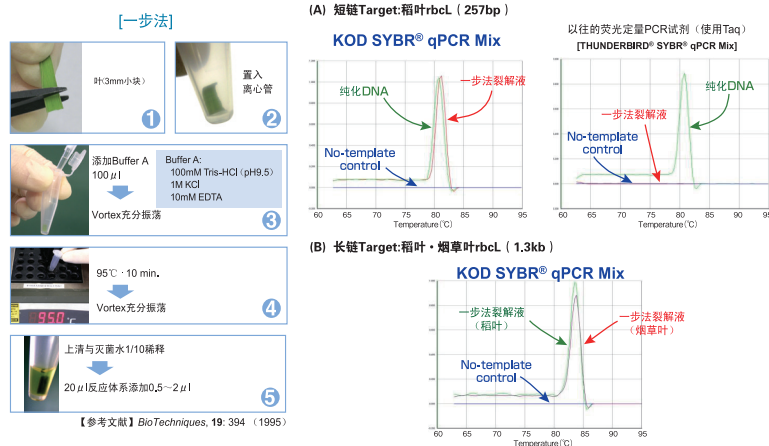


图 7. 粗样品的荧光定量 PCR 检测 (使用 ABI 7500)

(A) 使用一步法配制的水稻叶裂解液及纯化 DNA，对本公司以往产品和本产品进行了比较实验。结果显示，使用本产品的情况下，用裂解液确认到了特异性扩增，而用使用 Taq DNA polymerase 的以往产品则无法确认到特异性扩增。

(B) 对长度为 1.3kb 的目的片段进行了扩增。结果显示，使用本产品的情况下，裂解液样品也可以确认到特异性扩增。

④高特异性

由于抑制了引物二聚体等非特异性反应，因此在低拷贝区域也能够进行定量，可得到更广的可定量扩增区域。另外，将本产品与本公司荧光定量 PCR 专用 cDNA 合成试剂盒 [ReverTraAce® qPCR RT 系列] 组合使用，可更稳定地进行检测。

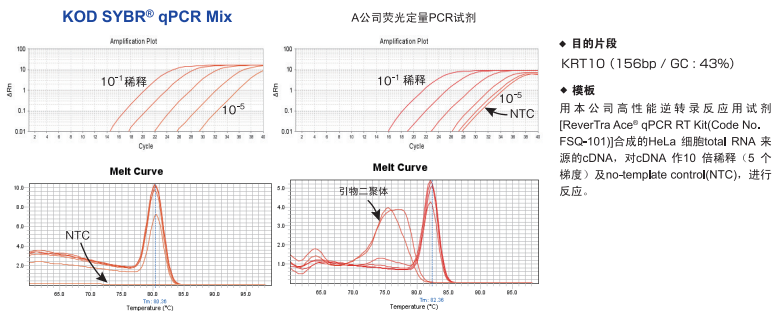


图 8. 与其他公司荧光定量 PCR 试剂的反应特异性比较。(使用 ABI StepOnePlus™)

对容易产生引物二聚体的目的片段进行荧光定量 PCR。结果显示，使用本产品的情况下，即便是低拷贝数样品及 no-template control(NTC) 引物二聚体也都得到了很好的抑制。

5 适用于各种仪器

本产品除适用于普通及高速的模块型 (Block type) 仪器外, 还适用于使用玻璃毛细管 (Glass Capillary Type) 的高速循环仪。由于 50× ROX reference dye 单独添附, 对于需要 passive reference 的仪器, 可根据各仪器的特征把 ROX 调整到最适浓度。

[适用仪器例]

| 仪 器 | ROX终浓度 (添加量) |
|---|-----------------|
| Applied Biosystems® 7000、7300、7700、7900HT、StepOne™、StepOnePlus™ | 1X (1/50量) |
| Applied Biosystems® 7500、7500Fast、Agilent Technologies Mx3000P、Mx3005P、Mx4000 | 0.1X (1/500量) |
| Roche公司仪器 (LightCycler® 2.0、LightCycler® Nano等)、Bio-Rad公司仪器 (MiniOpticon™、CFX96 Touch™等)、BioFlux Line Gene等 | 不需要添加 |

→ 用 途 : 荧光定量 PCR

→ 说 明

KOD SYBR® qPCR Mix 是使用 SYBR® Green I 检测体系的荧光定量 PCR 用 2× 浓度的 Master Mix 试剂。本试剂将除了 ROX (另外添附) 与引物以外的成分预先混合, 因此, 反应液的配制非常简单, 并且将各样品间荧光强度的偏差抑制在最小范围内, 可得到重复性很高的结果。

本产品将去除了 3' → 5' 核酸外切酶活性 (校正活性) 的 KOD exo(-) DNA polymerase 与最适化的 buffer 相组合, 在使用 SYBR® Green I 的分析检测中, 可以最大限度地发挥 KOD 出色的合成能力及不易受粗样品成分抑制的特性。

→ 注意事项

1 保存条件

经确认本产品反复冻融 10 次对品质没有影响。

2 引物设计

参照 1-4 页引物设计方法。

3 逆转录反应液的加入量

将普通逆转录试剂合成的 cDNA, 无需纯化, 用灭菌水等稀释后可直接添加到 Realtime PCR 反应液中。添加量不应超过总反应体系的 10%。而使用本公司 ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Code:FSQ-101)、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (Code:FSQ-201)、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code:FSQ-301) (→ 3-8 页) 时, 则最多可带入总反应体系 20% 的量。

→ 相关产品

1 Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒

| | | | | |
|--|---------|--------|---------|----------|
| ReverTra Ace® qPCR RT Kit | FSQ-101 | 200 次份 | ¥ 1,500 | → 3-10 页 |
| ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix | FSQ-201 | 200 次份 | ¥ 2,000 | → 3-8 页 |
| ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover | FSQ-301 | 200 次份 | ¥ 2,800 | → 3-8 页 |

新一代 THUNDERBIRD 荧光定量 Mix, 更快、更准、更方便!

高效率荧光定量 PCR Master Mix

THUNDERBIRD® Next qPCR Mix 系列

| THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix Coming soon | | |
|--|-------------|---------|
| Code: QPX-101T | 1ml × 1支 | ¥ 325 |
| Code: QPX-101 | 1.67ml × 3支 | ¥ 1,500 |

| THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix | | |
|----------------------------------|-------------|---------|
| Code: QPX-201T | 1ml × 1支 | ¥ 325 |
| Code: QPX-201 | 1.67ml × 3支 | ¥ 1,500 |

本品是基于 THUNDERBIRD® qPCR Mix (Code No. QPS-101、QPS-201) 进行组分改良后的高效率 Realtime PCR 用 Master Mix (2 x 浓度), 相比原产品进一步提高了反应特异性和 PCR 效率, 且内含通用规格的 passive reference dye 以及提高可视性的蓝色染料, 使用更加便捷。



→ 特征

① 更高的特异性

通过优化组分从而降低非特异性反应, 进一步提高了低拷贝样本检测时的准确度。

② 更广的可定量扩增区域

通过高效且特异的扩增, 可在更广的测定范围进行分析。

③ 可进行高速 PCR 循环

由于扩增效率高、快速循环条件下也可高效扩增。

④ 高速热启动

采用抗体法热启动的方式, 通过加热使抗体迅速失活并释放 DNA 聚合酶活性, 所以可设置较短的预变性时间。

⑤ 可均一地检测各种目的片段

使用了新的反应增强剂。将因目的片段不同而导致的 PCR 效率的误差抑制到了最低、可定量长至 500bp 的片段。

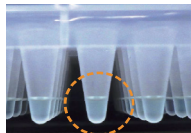
⑥ 可使用 UNG (防污染)

本产品组分中含有 dUTP。通过添加 Uracil-N-Glycosylase(UNG)*, 可防止 carryover 污染导致的假阳性。

* 本产品中不含有 UNG。请使用另外销售的 Uracil-DNA Glycosylase(UNG), Heat-labile(Code No. UNG-101)。

⑦ 含有蓝色染料 (视觉辅助)

本产品组分中含有蓝色染料。
分装之后的孔呈蓝色, 可以减少分装差错。
* 蓝色染料对 qPCR 反应及荧光信号无影响。



⑧ 适用于各种仪器

除了一般的模块型仪器外, 还可用于玻璃毛细管型高速循环仪。另外, 本产品的组分中含有 passive reference dye, 所以需要 passive reference 的仪器 (如: Applied Biosystems 公司的仪器、Agilent Technologies 公司的仪器等) 无需再添加 ROX。

[适用仪器例]:

| | |
|--------------------|---|
| Applied Biosystems | 7300 / 7500 / 7500 Fast / StepOne™ / StepOnePlus™ ViiA™ 7 / QuantStudio® |
| Roche Diagnostics | LightCycler® 1. x / 2.0 / Nano / 96 / 480 |
| Bio-Rad/MJ | MiniOpticon™ / CFX96 Touch |
| TaKaRa | Dice / DCell / Dice Lite / Dice III |
| QIAGEN | Rotor-Gene Q |
| BioFlux | Line Gene |

→ 用途: 荧光定量 PCR

产品内容:

<QPX-101T, QPX-201T>
qPCR Mix* 1ml × 1支
(50μl 反应体系使用 40 次)

<QPX-101, QPX-201>
qPCR Mix* 1.67ml × 3支
(50μl 反应体系使用 200 次)

* 含有 passive reference dye 可兼容不同 qPCR 仪器。蓝色染料只作为加样辅助, 不影响定量效果。

保存:

-20°C (避光保存)

※ 在短时间 (3 个月以内) 使用完毕的情况下, 可在 2~8°C 避光保存。
已确认反复冻融 10 次不会影响定量效果。

备注:

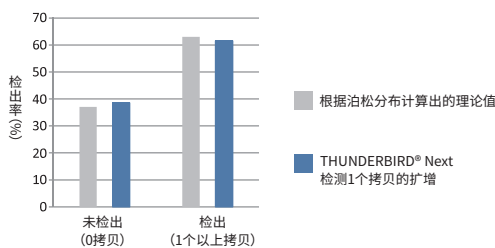
SYBR® 是 Molecular Probes Inc. 的注册商标。
TaqMan® 是 Roche Molecular Systems Inc. 的注册商标。

→ 结果示例

① SYBR® Green I 检测体系 1 个拷贝的扩增确认

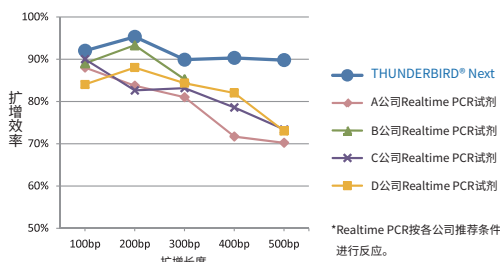
扩增 1 个拷贝的目的片段时，可认为 1 个拷贝的检测数与泊松分布的设定检测数相同。泊松分布的理论值中，0 拷贝的概率为 37%、1 个以上拷贝的概率为 63%。

因此，使用 THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix，以稀释的 1 个拷贝的沙门氏菌基因组为模板，N=96 进行检测。结果显示，未检测出的为 38.5%，检测出的为 61.5%，与根据泊松分布推测的检出率相同，这表明检测到了 1 个拷贝相当的模板。



② 100 ~ 500bp 长度范围目的片段的扩增

以人工合成的基因为模板，Forward 引物为共用引物，设计扩增长物为 100bp、200bp、300bp、400bp 及 500bp 的 Reverse 引物。使用这些引物，分别用 THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix 及各公司 Realtime PCR 试剂进行 $10^7 \sim 10^1$ 拷贝的扩增，比较各扩增长度的 PCR 效率。结果显示，用其他公司的产品时扩增效率低下或不能检测的 400bp 以上的目的片段，使用本产品检测时也未见扩增效率低下。



③ 体系配制过程中 PCR 反应液的稳定性

PCR 反应液中加入引物、模板 (HeLa 细胞 total RNA 来源的 cDNA)，室温避光温育 48 小时后，进行目的片段的扩增。结果显示，使用本公司原产品及其他公司的产品，室温放置后得到的 Ct 值出现了延迟，但是使用 THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix 扩增时，即使室温放置 48 小时处理后也显示出稳定的性能。黄色标记表示 ΔCt 在 0.5 以上。

| THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix | | | | 本公司原来的产品 | | | |
|----------------------------------|------------|-------------|-------------|----------|------------|-------------|-------------|
| 目的片段 | Ct值 (新制备的) | Ct值 (48hr后) | ΔCt | 目的片段 | Ct值 (新制备的) | Ct值 (48hr后) | ΔCt |
| G3PDH | 26.61 | 26.63 | 0.02 | G3PDH | 30.38 | 31.17 | 0.79 |
| ACTB | 23.72 | 23.85 | 0.13 | ACTB | 23.43 | 23.44 | 0.01 |
| GNB2L1 | 24.63 | 24.66 | 0.03 | GNB2L1 | 24.01 | 24.68 | 0.67 |
| PBGD | 31.36 | 31.00 | -0.36 | PBGD | 31.27 | 31.01 | -0.26 |
| ABL1 | 28.69 | 28.38 | -0.31 | ABL1 | 28.45 | 30.18 | 1.73 |
| B2M | 23.58 | 23.56 | -0.02 | B2M | 22.83 | 23.05 | 0.22 |
| RPL32 | 24.11 | 23.97 | -0.14 | RPL32 | 23.56 | 24.11 | 0.55 |
| TUBB | 31.51 | 31.05 | -0.46 | TUBB | 33.64 | 34.88 | 1.24 |

| D公司Realtime PCR试剂 | | | | F公司Realtime PCR试剂 | | | |
|-------------------|------------|-------------|-------------|-------------------|------------|-------------|-------------|
| 目的片段 | Ct值 (新制备的) | Ct值 (48hr后) | ΔCt | 目的片段 | Ct值 (新制备的) | Ct值 (48hr后) | ΔCt |
| G3PDH | 28.83 | 29.16 | 0.33 | G3PDH | 28.17 | 30.32 | 2.15 |
| ACTB | 23.45 | 25.12 | 1.67 | ACTB | 25.02 | 26.25 | 1.23 |
| GNB2L1 | 23.83 | 24.71 | 0.88 | GNB2L1 | 25.82 | 26.64 | 0.82 |
| PBGD | 29.95 | 30.98 | 1.03 | PBGD | 32.35 | 33.38 | 1.03 |
| ABL1 | 28.19 | 28.75 | 0.56 | ABL1 | 30.46 | 31.23 | 0.77 |
| B2M | 22.65 | 22.72 | 0.07 | B2M | 22.65 | 22.72 | 0.07 |
| RPL32 | 23.67 | 23.42 | -0.25 | RPL32 | 25.41 | 26.11 | 0.7 |
| TUBB | 31.54 | 28.12 | -3.42 | TUBB | 30.92 | 31.75 | 0.83 |

*各目的片段按N=2进行得到的平均值

基本反应条件:

<SYBR® Green I Assay>

| | |
|------------------------|------------|
| 灭菌水 | X μ l |
| qPCR Mix | 10 μ l |
| Forward Primer | 6pmoles |
| Reverse Primer | 6pmoles |
| UNG [Code No. UNG-101] | 0.4U* |
| DNA 样品 | Y μ l |
| Total Volume | 20 μ l |

(UNG* 反应: 20 ~ 25°C 10min.)

* 请先确认仪器是否允许设置为 10 秒。

条件以另外销售的 Uracil-DNA Glycosylase(UNG), Heat-labile [Code No. UNG-101] 为列。

Cycle

<2 步法 PCR · 快速循环 >

95°C, 30sec.

↓

95°C, 3sec.

60°C, 10sec.*

40cycles

* 请先确认仪器是否允许设置为 10 秒。

<2 步法 PCR · 常规循环 >

95°C, 30sec.

↓

95°C, 5sec.

60°C, 30sec.*

40cycles

<3 步法 PCR >

95°C, 20~60sec.

↓

95°C, 1~5sec.

55~65°C, 5~30sec.

72°C, 10~60sec.

40 cycles

※Tm 值低于 60°C 或扩增效率较低时请尝试 3 步法。

→ 相关产品

① Carryover 污染应对 · 防止假阳性试剂

| | | | | |
|--|---------|--------------------------|--------|----------|
| Uracil-DNA Glycosylase (UNG), Heat-labile | UNG-101 | 200 μ l \times 1 支 | ¥1,000 | → 2-38 页 |
| ② Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒 | | | | |
| ReverTra Ace® qPCR RT Kit | FSQ-101 | 200 次份 | ¥1,500 | → 1-23 页 |
| ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix | FSQ-201 | 200 次份 | ¥2,000 | → 1-21 页 |
| ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover | FSQ-301 | 200 次份 | ¥2,800 | → 1-21 页 |

荧光定量 PCR 界的「幸运鸟」诞生。解决可测定区域、特异性等烦恼。

高效率荧光定量 PCR Master Mix < 以抑制引物二聚体为着眼点开发 >

THUNDERBIRD® qPCR Mix 系列

THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix

Code: QPS-101 1.67ml × 3支 ¥1,500

THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix

Code: QPS-201 1.67ml × 3支 ¥1,500

THUNDERBIRD® qPCR Mix 是在 Taq DNA polymerase 基础上开发的高效率 Realtime PCR 用 Master Mix (2 × 浓度)。适用于以 cDNA、病毒 DNA 等为模板的 Realtime PCR 检测。针对 TaqMan® 探针法及 SYBR® Green I 染料法, 本公司有两种试剂盒可供选择。



产品内容:

<QPS-101, QPS-201>
qPCR Mix 1.67ml × 3支
50 × ROX reference dye 250 μl
(50 μl 反应体系使用 200 次)

保存:

-20°C (避光保存)
※ 在短时间 (3 个月以内) 使用完毕的情况下, 可在 2~8°C 避光保存。

参考文献:

- 1) R.M.de Breuil et al., *PCR Methods Appl.*, 3:57-59 (1993)
- 2) P.M.Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7276-7280. (1991)

备注:

LightCycler® 是 Idaho Technology Inc. 的注册商标。

SYBR® 是 Molecular Probes Inc. 的注册商标。
TaqMan® 是 Roche Molecular Systems Inc. 的注册商标。

ABI PRISM® 是 Applied Biosystems Inc. 的注册商标。

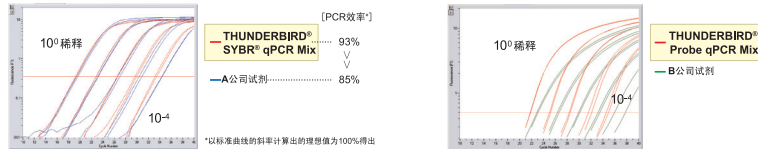
→ 特征

1 高特异性 (降低引物二聚体)

通过对组分的最优化, 使得 PCR 的特异性更高。通过降低非特异性反应, 使得 SYBR® Green I 及 TaqMan® Assay 等对低拷贝目的片段的检测灵敏度更高。(参照结果示例 1)

2 对各种目的片段均可均一地检测

采用了新的增强剂, 对各种目的片段 PCR 效率的波动可控制在最小范围内。

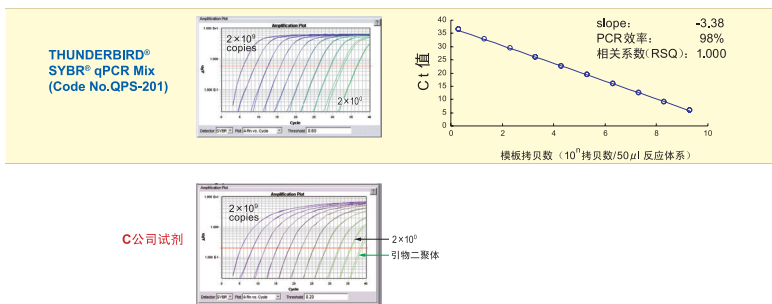


通过 SYBR® Green I 检测体系对 Norovirus GI cDNA 的检测 (使用缩合引物)
(使用 Roche Diagnostics LightCycler® 1.1)

通过 TaqMan® 检测体系对 GAPDH cDNA 的定量
(使用 Roche Diagnostics LightCycler® 1.1)

3 更广的可定量扩增区域

由于产品的高效率、高特异性, 可对更广的测定范围进行分析。



通过 SYBR® Green I 检测体系对质粒模板的检测 (使用 Applied Biosystems 7900HT)

4 高适用性 (可用于各种仪器)

除适用于普通及高速的模块型 (Block Type) 仪器外, 还适用于使用玻璃毛细管 (Glass Capillary Type) 的高速循环仪。由于另外添附了 50 × ROX reference dye, 对于使用 Passive Reference 的仪器 (如 Applied Biosystems 公司制造的仪器、Stratagene 公司制造的仪器), 可根据各种仪器的特征把 ROX 调整到最适浓度。

代表的对应仪器

| | |
|----------------------------------|-------------------------------|
| Applied Biosystems | ABI PRISM® 7000 |
| | ABI PRISM® 7700 |
| | Applied Biosystems® 7300 |
| | Applied Biosystems® 7500 |
| | Applied Biosystems® 7500 Fast |
| | Applied Biosystems® 7900HT |
| | Applied Biosystems® StepOne |
| Applied Biosystems® StepOne Plus | |
| Roche Diagnostics | LightCycler® 1.x/2.0 |
| | LightCycler® Nano |
| | LightCycler® 480 |

| | |
|------------|--------------------------------------|
| Bio-Rad/MJ | iCycler iQ, MiniOpticon, CFX96 Touch |
| Stratagene | Mx3000P |
| | Mx3005P |
| TaKaRa | Thermal Cycler Dice® |
| BioFlux | Line Gene |

*若使用表格中未提到的仪器, 欢迎电话垂询。

5 高速热启动

本产品采用了抗 Taq 聚合酶抗体的热启动系统。由于通过升温能使抗体迅速失活, 因此预变性时间可以设定为很短。

→ 用途: 荧光定量 PCR**→ 说明**

本产品采用了新的增强剂等方法对组分进行了根本性的改良, 反应特异性和 PCR 效率得到了飞跃性的提高。通过这些改良, 可得到更广的可定量扩增区域(dynamic range), 除适用于普通及高速的模块型(Block Type)仪器外, 还适用于玻璃毛细管(Glass Capillary Type)高速循环仪等各种仪器。

→ 注意事项**1 保存条件**

经确认本产品反复冻融 10 次对品质没有影响。

2 引物设计

参照 1-4 页引物设计方法。

3 逆转录反应液的加入量

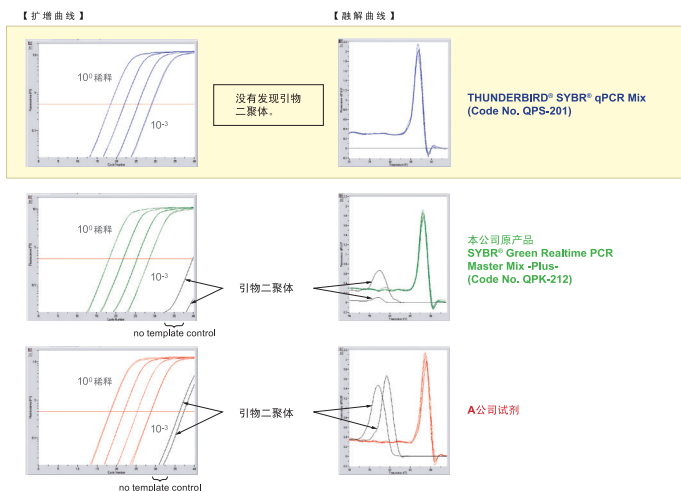
将普通逆转录反应试剂合成的 cDNA, 无需纯化, 用灭菌水等稀释后可直接添加到 Realtime PCR 反应液中。

添加量不应超过总反应体系的 10%。使用公司产品 ReverTra Ace qPCR RT Kit 系列(→ 3-8 页), 可添加最多至 20% 的液量。

→ 结果示例**1 SYBR® Green I 检测体系反应特异性的比较**

使用可能产生引物二聚体的引物对, 对各种 Realtime PCR 试剂的反应特异性进行比较。

引物对用针对人 β -Actin cDNA 的, 模板使用本公司高性能逆转录反应应用试剂「ReverTra Ace qPCR RT Kit (Code No.FSQ-101)」合成的 HeLa 细胞 Total RNA 来源的 cDNA, 对 cDNA 的 10 倍梯度稀释液(4 个梯度)和 no-template control (NTC) 分别进行两次反应。(使用 Roche Diagnostics LightCycler® 1.1)

**→ 相关产品****1 Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒**

| | | | | |
|--|---------|--------|---------|----------|
| ReverTra Ace® qPCR RT Kit | FSQ-101 | 200 次份 | ¥ 1,500 | → 3-10 页 |
| ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix | FSQ-201 | 200 次份 | ¥ 2,000 | → 3-8 页 |
| ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover | FSQ-301 | 200 次份 | ¥ 2,800 | → 3-8 页 |

基本反应条件:**<SYBR® Green I Assay>**

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| 灭菌水 | X μ l |
| qPCR Mix | 10 μ l |
| Forward Primer | 6 pmoles |
| Reverse Primer | 6 pmoles |
| 50 \times ROX reference dye | 0.4/0.04 μ l* |
| DNA 样品 | Y μ l |
| Total Volume | 20 μ l |

*50 \times ROX reference dye, 是对于使用 Passive Reference 的仪器(如 Applied Biosystems 公司制造的仪器等), 为校正各孔间的荧光强度及分注误差而使用。最适添加量根据仪器不同而不同。不用 Passive Reference 进行校正的仪器无需添加。

Cycle**<2 步法 PCR>**

| | | | |
|----------------|-----------------------|---|-----------|
| 95°C, | 20~60sec. | ↓ | 40 cycles |
| 95°C, 60°C, | 1~15sec. 30~60sec. | | |

<3 步法 PCR>

| | | | |
|----------------------------|-----------------------------------|---|-----------|
| 95°C, | 20~60sec. | ↓ | 40 cycles |
| 95°C, 55~65°C, 72°C, | 1~15sec. 5~30sec. 30~60sec. | | |

※ 退火温度请设定在引物 Tm~Tm-5°C 的范围内。

※ 一般情况下, 目的片段在 300bp 以下时, 延伸时间 30 秒即可进行充分的反应。但一部分仪器为测定稳定的荧光, 延伸时间需大于 30 秒。扩增曲线散乱, 或各孔间的差异较大时, 请设定较长的延伸时间(45~60 秒)。

高性能、性价比极佳的 Realtime PCR 试剂。

高性能 Realtime PCR Master Mix

Realtime PCR Master Mix 系列

| | | | | | | | | |
|--|----------|--------|--|----------|--------|---|----------|--------|
| Realtime PCR Master Mix Code: QPK-101 | 1ml × 5支 | ¥1,500 | SYBR® Green Realtime PCR Master Mix Code: QPK-201 | 1ml × 5支 | ¥1,500 | SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus- Code: QPK-212 | 1ml × 5支 | ¥1,600 |
|--|----------|--------|--|----------|--------|---|----------|--------|

本试剂是以 Taq DNA polymerase 为基础开发的通用性很高的 Realtime PCR 用 2 × Master Mix。可获得重复性很好的结果。



产品内容:

| | |
|--|----------|
| <QPK-101, QPK-201> | |
| Master Mix | 1ml × 5支 |
| (50 μl 反应体系可用 200 次, 20 μl 反应体系可用 500 次) | |
| <QPK-212> | |
| Master Mix | 1ml × 5支 |
| Plus solution | 1ml × 1支 |
| (50 μl 反应体系可用 200 次, 20 μl 反应体系可用 500 次) | |

保存:

-20°C (避光保存)

备注:

LightCycler® 是 Idaho Technology Inc. 的注册商标。
SYBR® 是 Molecular Probes Inc. 的注册商标。
TaqMan® 是 Roche Molecular Systems Inc. 的注册商标。
ABI PRISM® 是 Applied Biosystems Inc. 的注册商标。

商品使用文献:

- 1) Y. Azuma et al., *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **30(4)**: 655-660(2007)
- 2) Hua Wang et al., *J. Bone Miner. Res.* **23**:939-948(2008)

网络版追加信息:

- 简要备注
- 实验例

基本反应条件:

<SYBR® Green I Assay>

| | |
|--------------|-----------------|
| 灭菌水 | X μl |
| Master Mix | 25 μl |
| 各引物 | 10 pmoles each~ |
| DNA 样品 | Y μl |
| Total Volume | 50 μl |

| | |
|-----------|--------|
| Cycle | |
| 95°C, | 60sec. |
| ↓ | |
| 95°C, | 15sec. |
| 55~65°C, | 15sec. |
| 72°C, | 45sec. |
| 40 cycles | |

※ 退火温度请根据引物的 Tm 值在 55~65°C 之间调整。

※ 扩增片段最大如在 200bp 左右, 则延伸反应的时间为 45sec. 也没有问题。

→ 特征

① 高特异性

为抑制非特异性反应, 采用了含抗 Taq 单克隆抗体的热启动法。请见 (→ 2-5 页)

② 广泛的应用性

可用于 Probe Assay 和 SYBR® Green Assay 等方法。

③ 高通用性 (可用于各种仪器)

- 因产品中已添加了 Passive Reference, 因此可用于需要校正荧光信号的仪器 (如 Applied Biosystem 公司的 ABI PRISM® 7700 等)。
- 可应用于使用 Glass Capillary 分析体系的仪器 (如 Roche 公司的 LightCycler® 等)。

④ 高可靠性 [SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -plus-]

对 Buffer 进行了最优化处理, 可抑制 SYBR® Green 分析时出现的引物二聚体等非特异性反应的产生, 提高了特异性和重现性。

→ 用途: 荧光定量 PCR

→ 说明

① 各产品的性能、用途等请参照下表。

| 品名 | 用途 | 对应Passive Reference | 对应Glass Capillary | 1 step RT-PCR* | 可靠性 |
|--|-------------------|---------------------|-------------------|----------------|------|
| Realtime PCR Master Mix | Probe Assay** | ○ | ○ | ○ | ☆☆☆ |
| SYBR® Green Realtime PCR Master Mix | SYBR® Green Assay | ○ | ○ | ○ | ☆☆☆ |
| SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus- | SYBR® Green Assay | ○ | ○ | - | ☆☆☆☆ |

*逆转录酶 ReverTra Ace (→3-14页) 与 RNase Inhibitor (→3-16页) 组合使用, 可进行一步法PCR。

**可用于 TaqMan® Probe Assay 和 Hybridization Probe Assay 等。

→ 相关产品

① Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒

| | | | | |
|--|---------|--------|--------|----------|
| ReverTra Ace® qPCR RT Kit | FSQ-101 | 200 次份 | ¥1,500 | → 3-10 页 |
| ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix | FSQ-201 | 200 次份 | ¥2,000 | → 3-8 页 |
| ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover | FSQ-301 | 200 次份 | ¥2,800 | → 3-8 页 |

对 Illumina 平台二代测序文库进行准确且低偏差的定量。

Illumina 公司二代测序仪用文库定量试剂盒

GenNext® NGS Library Quantification Kit

Code: NLQ-101 500次 ¥ 5,450

Code: NLQ-101S 50次 ¥ 1,100

※ 表示的是 20μl 反应体系时的使用次数。

产品内容:

<KOD SYBR® qPCR Mix> *

- KOD SYBR® qPCR Mix
- 50×ROX reference dye

<Standard & Primer Set>

- Standard DNA 1~6**
- 5×Primer mix
- 50×Dilution Buffer

* 包含一套完整的 KOD SYBR® qPCR Mix (Code No. QKD-201)

** 包含浓度为 20pM、2pM、0.2pM、0.02pM、0.002pM、0.0002pM 的 Standard DNA。

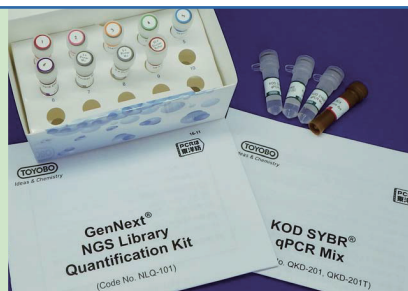
保存:

-20°C

备注:

SYBR® 是 Thermo Fisher Scientific K.K. 的注册商标。

GenNext® NGS Library Quantification Kit 是 Illumina 二代测序用的文库定量试剂盒。针对于 Illumina 采用的 P5、P7 接头序列，特异且准确地只定量能够结合在 flow cell 上的文库序列。



→ 特征

① 低偏差地准确定量

使用了 KOD SYBR® qPCR Mix，不易受文库 GC 含量及长度影响，无论何种文库都可以正确地定量。使用本试剂盒定量得到的值，可以得到稳定的簇密度。

② 更广的可定量区域

备有从 20 pM 到 0.0002 pM 的 6 个浓度的 Standard DNA，可以在较广的范围内进行准确的定量。

③ 简便

本产品含有文库定量必需的全部试剂（qPCR 试剂、Primer Mix、Standard DNA、以及文库稀释 buffer），可以很方便地进行文库的定量。

→ 用途: Illumina 公司二代测序用文库的定量

→ 说明

GenNext® NGS Library Quantification Kit 是 Illumina 二代测序用的文库定量试剂盒。Illumina 公司 NGS 测序仪上加载的文库量对数据的数量及质量有很大影响。文库量过少，簇密度就较低，得到的测序数据量就比较少。相反，文库量过多，簇清晰度就变差，数据质量就会下降。因此，文库的正确定量就变得非常重要。文库定量的方法有分光光度检测法及荧光测定法，这些测定法中，因为测定的是全部的 DNA，所以不能正确地测定对测序有效的包含 P5、P7 接头的 DNA 的浓度。GenNext® NGS Library Quantification Kit 中，设计了能与 Illumina 公司采用的 P5、P7 序列配对的引物，来进行 qPCR 法分析，能准确定量能够结合在 Flow cell 的文库。另外，因为使用了 KOD SYBR® qPCR Mix (→ 1-13 页)，针对长链及 GC 富集的目的片段，也可以稳定进行文库定量。

→ 注意事项

① 5x Primer Mix、50x Rox reference dye 及灭菌蒸馏水

预先混合到 KOD SYBR® qPCR Mix 里, 添加 4μl 文库或 Standard DNA, 可配制成能够直接使用的混合液进行保存。

② KOD SYBR® qPCR Mix

已确认反复冻融 10 次对品质没有影响。

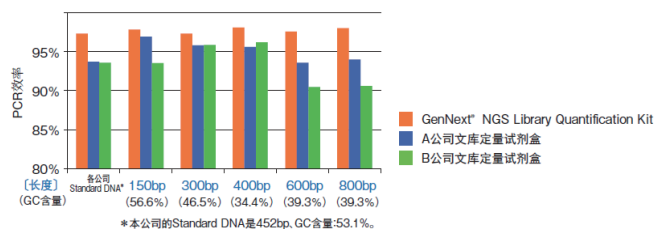
③ Standard DNA

不能对 Illumina 以外的二代测序仪器制备的文库进行定量。

→ 实验例

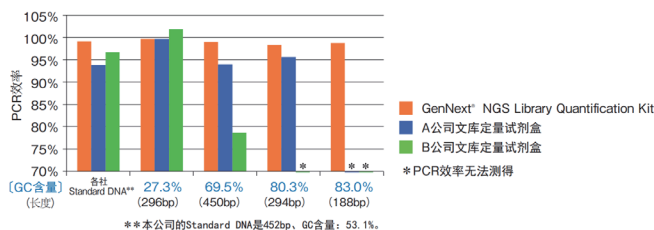
① 各种长度的目的片段的 PCR 效率

用各公司的文库定量试剂盒对附加有接头序列的 150~800bp 的模板 DNA 进行分析, 比较了 PCR 效率。结果显示, 其他公司的文库定量试剂盒随着目的片段长度的变长, 可以看到 PCR 效率降低, 本试剂盒没有因目的片段长度变化而出现 PCR 效率下降。



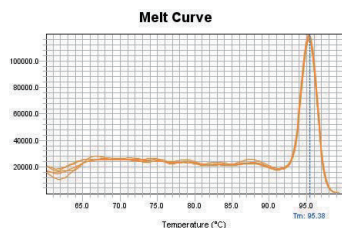
② 各种 GC 含量的目的片段的 PCR 效率比较

用各个公司的文库定量试剂盒对附加有接头序列的各种 GC 含量的模板 DNA 进行分析, 比较 PCR 效率。结果显示: 其他公司的文库定量试剂盒在定量 GC 含量高的目的片段时, 如融解曲线分析图所示, 不能确认目的片段的扩增, PCR 效率也不能测定。另一方面, 使用本试剂盒可特异地扩增全部的目的片段, 而且各目的片段的 PCR 效率误差也最小。通常, 含有 CpG 的启动子区域或嗜热菌等细菌中 GC 含量比较高。在对其进行文库定量时, 使用不易受 GC 影响的本产品就可以正确地进行定量。

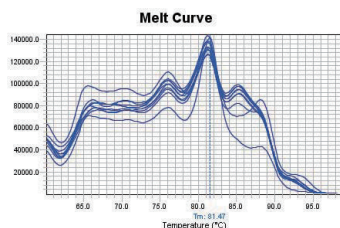


【GC 含量 83.0% 的目的基因的融解曲线】

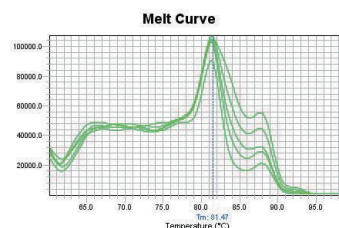
GenNext® NGS Library Quantification Kit



A 公司文库定量试剂盒



B 公司文库定量试剂盒



→ 相关产品

① 高效率 SYBR® Green I 检测用实时荧光定量 PCR 试剂

| KOD SYBR® qPCR Mix | QKD-201T | 1ml × 1 支 (40 次) | ¥ 500 | → 1-13 页 |
|--------------------|----------|----------------------|---------|----------|
| | QKD-201 | 1.67ml × 3 支 (200 次) | ¥ 2,450 | → 1-13 页 |

基本反应条件:

| | |
|-------------------------------|------------|
| KOD SYBR® PCR Mix | 10μl |
| 50x ROX reference dye | 0.4/0.04μl |
| 5x Primer Mix | 4μl |
| Library Sample / Standard DNA | 4μl |
| 灭菌蒸馏水 | 1.6/1.96μl |

Total Volume 20μl

PCR 反应条件

| | |
|----------------------------|----------|
| 98°C, 2min. ^{*1} | 35cycles |
| 98°C, 10sec. | |
| 65°C, 10sec. | |
| 68°C, 30sec. ^{*2} | |

*1 本产品因为使用了抗体, 采用了热启动体系, 所以请进行 98°C, 2min. 的预变性, 使抗体失活。

*2 600bp 以上的文库时, 请设定为 45 sec.

简便·低成本地构建高质量 Illumina 二代测序平台兼容的 DNA 文库。

Illumina 公司二代测序仪用文库构建试剂盒

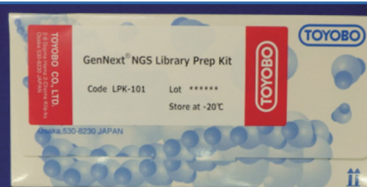
GenNext® NGS Library Prep Kit

| | | |
|----------------|------|---------|
| Code: LPK-101T | 8次份 | ¥2,100 |
| Code: LPK-101 | 24次份 | ¥4,100 |
| Code: LPK-101L | 96次份 | ¥12,600 |

※ 表示的是使用 50μl 片段化 DNA 时的使用次数。

GenNext® NGS Library Prep Kit 可从片段化的双链 DNA 或 PCR 产物开始，制备 Illumina® 公司 NGS 测序用文库。使用本产品，可简便且迅速地制备文库。

Input 的 DNA 量少，需要扩增文库时，可使用基因改良型 KOD DNA polymerase 开发的高保真性 PCR 酶，低偏差地扩增末端带有 Adapter 序列的文库。



产品内容：

〈LPK-101〉

| | |
|----------------------------------|--------|
| End Repair and A-tailing Buffer | 240 μl |
| End Repair and A-tailing Enzyme | 60 μl |
| Ligation Solution | 1.2 ml |
| Library Amplification Master Mix | 690 μl |
| Library Amplification Primer Mix | 138 μl |

* 本试剂盒不含有 Adapter 以及纯化用磁珠。

保存：

-20°C

※ 如果需要长期保存，请存放于 -30°C。

备注：

Illumina®、TruSeq™ 是 Illumina Inc. 的注册商标。

MultiNA® 是岛津制作所的注册商标。

→ 特征

① 简便且快速的操作流程

从末端修复及 3' 末端加 A 到 Adapter 连接操作都在同一个反应容器中进行。末端修复及 3' 末端加 A 进行 15 分钟，Adapter 的连接需要 15 分钟即完成。文库扩增时使用退火 10 秒、延伸 15 秒的循环即可进行反应。

② 范围较广的 input 量

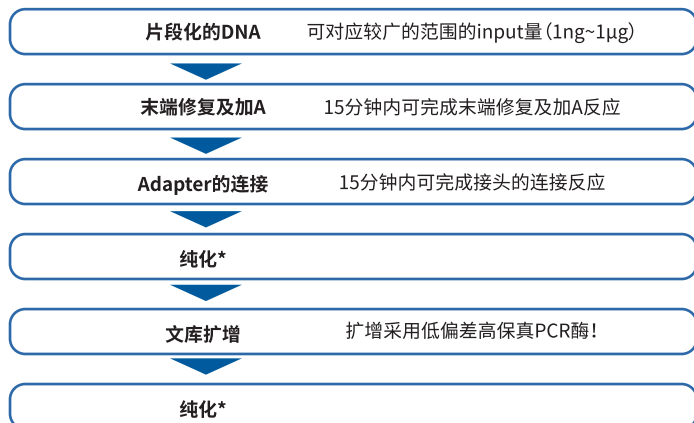
对应较广范围的 input 量 (1ng ~ 1μg) 进行的设计。

③ 低偏差的文库扩增文库扩增

文库扩增时使用的 Library Amplification Master Mix 是使用基因改良型 KOD DNA polymerase 进行开发的高保真 PCR 酶。因 GC 不均导致的影响降到了最低、可均一地扩增各种片段。

→ 用途：Illumina 公司二代测序用文库的制备

→ 基本流程



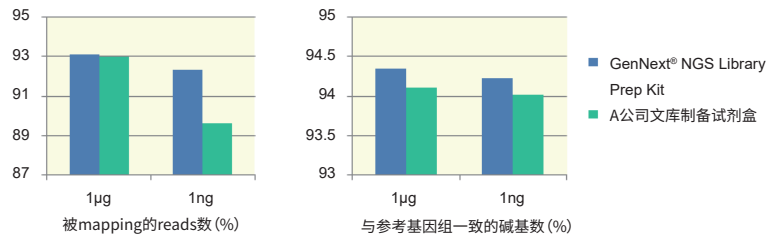
*本产品中不含有Adapter与纯化用磁珠。

→ 实验例

① NGS 评价文库制备试剂盒

使用 MiSeq (Illumina 公司) 及 MiSeq Reagent Kit v2 (300 Cycles) (Illumina 公司) 进行大肠杆菌基因组 (1 μ g PCR Free 或 1ng 用 12 循环进行扩增) 的 NGS 分析。文库的制备使用 GenNext[®] NGS Library Prep Kit 或 A 公司文库制备试剂盒进行。文库数据为了与 read 数相等, 进行 down sampling, 各样品收集 100 万 read 数, 进行分析。分析是使用 CLC Genomics Workbench (QIAGEN 公司 / CLC bio) 进行的。

结果显示, 使用 GenNext[®] NGS Library Prep Kit 比使用其他公司的试剂, 得到了更好的 mapping 效率与更低的错误率。

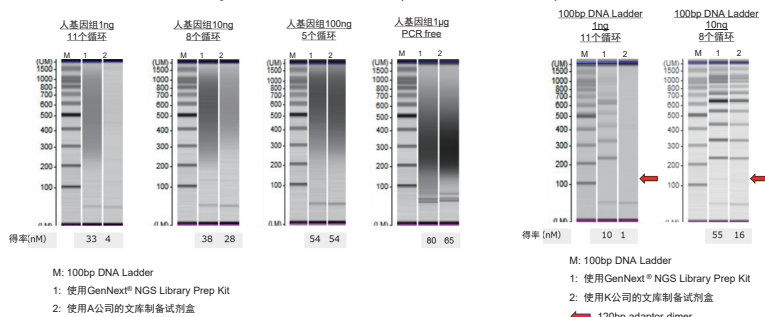


② 文库得率及分布的比较

以片段化处理过的人基因组 DNA 1、10、100ng、大肠杆菌基因组 DNA 1 μ g、以及 100bp DNA Ladder 1、10ng 开始, 使用 GenNext[®] NGS Library Prep Kit 或 A 公司文库制备试剂盒进行文库的制备。

Adapter 是使用 Illumina 公司的 Index Adapter, 文库的 cleanup 是使用 Agencourt AMPure XP 的试剂 (Beckman Coulter)。

1 μ g 没有扩增、1ng 用 11 个循环、10ng 用 8 个循环、100ng 用 5 个循环进行扩增, 文库 size 的分布用 MultiNA[®] (岛津生产公司) 的产品进行确认。文库的得率用 GenNext[®] NGS Library Quantification Kit(Code: NLQ-101) 进行确认。



进行文库 size 分布的确认时, 用本公司 GenNext[®] NGS Library Prep Kit 和 A 公司试剂时, 结果相同; 低 input 量时, 使用 GenNext[®] NGS Library Prep Kit, 与使用 A 公司的试剂相比, 可得到较高的得率。所有文库均得到了 4nM 以上的得率, 都满足 MiSeq 平台上机条件。

→ 相关产品

① Illumina 公司 NGS 用文库定量试剂盒

| | | | | |
|---|---------|--------|---------|----------|
| GenNext [®] NGS Library Quantification Kit | NLQ-101 | 500 次份 | ¥ 5,450 | → 1-22 页 |
|---|---------|--------|---------|----------|

使用 [RamDA-seq™ 技术] 从单细胞或微量 RNA 中获得高质量 cDNA !

NGS 分析 / Realtime PCR 用 cDNA 合成试剂盒

GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit

| | | | |
|-------------------------------------|----------------|------|----------|
| GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit | Code: RMD-101T | 24次份 | ¥ 15,000 |
| | Code: RMD-101 | 96次份 | ¥ 53,000 |
| RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit | Code: RMD-201T | 24次份 | ¥ 7,500 |
| | Code: RMD-201 | 96次份 | ¥ 26,500 |

NSR Primer

| | | |
|---------------|------|---------|
| Code: NSR-101 | 96次份 | ¥ 3,000 |
| Code: NSR-102 | 96次份 | ¥ 3,000 |

RamDA Cell Lysis Kit

| | | |
|---------------|---------|---------|
| Code: RMD-301 | 1,152次份 | ¥ 2,000 |
|---------------|---------|---------|

本产品是从单细胞或微量 RNA 中合成高质量 cDNA 的试剂盒。其中 RamDA-seq™ Single Cell Kit 的产物用于 full-length total RNA-seq 文库制备，RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit 的产物作为 Realtime PCR 的模板进行高灵敏度的基因表达分析。由于采用了 RT-RamDA™ 技术，本产品不仅能覆盖 poly(A) RNA，而且能高灵敏度地合成 non-poly(A) 来源的 cDNA。相比原来的方法能检测到更多基因。



产品内容:

| | |
|---------------------------------|-------|
| (RMD-101) | |
| Lysis Buffer | 480μl |
| Lysis Enhancer | 108μl |
| RNase Inhibitor | 22μl |
| Nuclease free water | 960μl |
| RT-RamDA™ Buffer | 240μl |
| RT-RamDA™ Enzyme Mix | 54μl |
| RT-RamDA™ Primer Mix | 54μl |
| gDNA Remover | 54μl |
| 2nd strand synthesis Buffer | 330μl |
| 2nd strand synthesis Enzyme | 55μl |
| 2nd strand synthesis Primer Mix | 275μl |
| (RMD-201) | |
| Lysis Buffer | 480μl |
| Lysis Enhancer | 108μl |
| RNase Inhibitor | 22μl |
| Nuclease free water | 960μl |
| RT-RamDA™ Buffer | 240μl |
| RT-RamDA™ Enzyme Mix | 54μl |
| RT-RamDA™ Primer Mix | 54μl |
| gDNA Remover | 54μl |

※ 对于文库制备，除本产品外，还需要磁珠 (Beckman Coulter 公司的 Agencourt AMPure XP) 以及文库制备试剂 (Illumina 公司的 Nextera XT DNA Sample Preparation Kit)。

※ 本试剂盒不包含 NSR Primer。建议 NSR Primer Set for human(NSR-101) 用于人源样本，NSR Primer Set for mouse(NSR-102) 用于鼠源样本。

保存:

-20°C

备注:

RamDA-seq™、RT-RamDA™ 是日本理化学研究所的注册商标。

→ 特征

① 可使用单细胞及微量 RNA

可以使用 1~100 个细胞或者 10pg~1ng total RNA 作为起始模板制备 cDNA。

② 可以制备全长 cDNA

现有的只使用 Oligo-dT 引物的方法难以分析 10kb 以上的 RNA，使用本产品可以制备出测序 reads 覆盖全长 RNA 的 cDNA。

③ 除了 poly(A) RNA，还可检测出 non-poly(A) RNA

借助 NSR(Not so random) 引物，可检测到用现有方法难以检测的 non-poly(A) RNA。

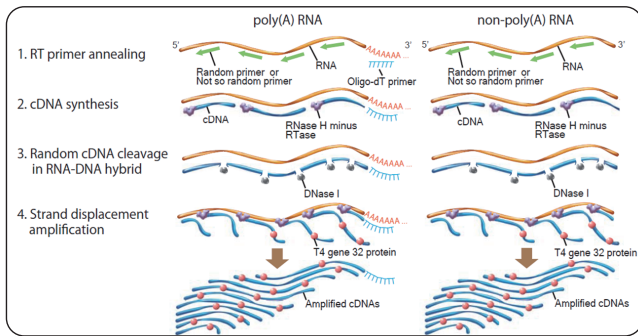
④ 相比原来技术，检测到的基因数大大提高了

可检测组蛋白 RNA、lncRNA、pre-mRNA、circRNA 等各种类型的 RNA。

→ 说明

RamDA-seq™ 是由日本理化学研究所·生命机能科学研究中心·生物信息学研究开发小组研发的「Random Displacement Amplification Sequencing」技术。现有的只使用 Oligo-dT 引物的技术无法覆盖 non-poly(A) RNA，并且由于逆转录可能出现的延伸中止，要得到全长数据比较困难。random 或 NSR 引物可以从 RNA 全部位置引导 cDNA 合成，从而消除了 poly(A) RNA 的限制，更容易得到 RNA 全长 reads。此外，RamDA-seq™ 法在 cDNA 合成的同时完成扩增，无需额外引入 adapter，也无需 PCR 反应，从而降低偏差。

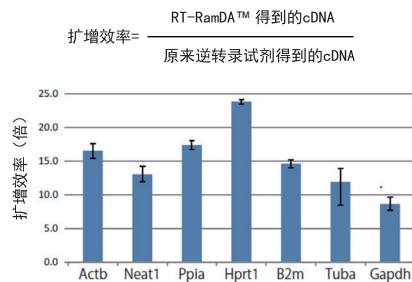
*NSR 是 Not so random 的缩写，NSR 引物是指为抑制 rRNA 逆转录成 cDNA，利用计算机算法将 18S、28S RNA 相关的序列剔除后的随机引物。建议 NSR Primer Set for human (NSR-101) 用于人源样本，NSR Primer Set for mouse(NSR-102) 用于鼠源样本。



→ 实验例

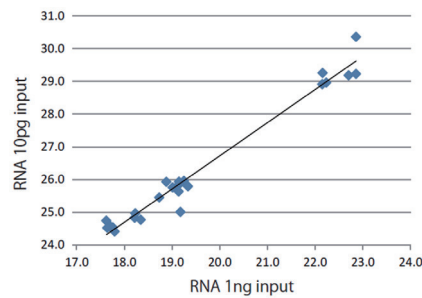
1 cDNA 扩增效率的验证

由 NIH3T3 Total RNA 10pg 开始，分别用以前的试剂及 RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit 制备 cDNA，通过 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix[Code No. QPS-201] 进行 Realtime PCR。结果显示，RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit 得到的 cDNA 量是以前试剂得到的 cDNA 量的 9 倍以上。



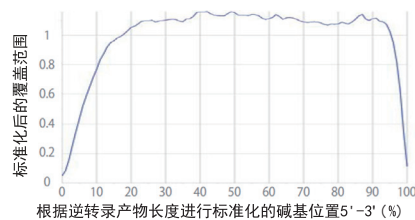
2 input RNA 使用量的验证

分别使用 10pg 和 1ng NIH3T3 Total RNA，用 RT-RamDA™ cDNA Synthesis Kit 制备 cDNA，通过 Realtime PCR 比较 8 个基因 (N=3) 的 Ct 值。结果显示，10pg 的 input 量和 1ng 的 input 量具有高度相关性，即使是微量模板也可高效制备 cDNA。



3 覆盖范围均一性的验证

以 10pg mES total RNA 开始，使用 GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 制备 cDNA，合成双链 DNA 后构建文库，使用 illumina MiSeq 仪器进行 NGS 分析。结果显示，制备的文库基本覆盖了全部基因。

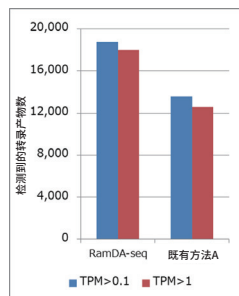


4 可检测基因数的比较及各类 RNA Reads 数的验证

以 10pg mES total RNA 开始，使用我司 GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 搭配 NSR Primer Set for mouse 与 A 公司的同类试剂盒同时制备 cDNA，并进行 NGS 分析。我司产品无需进行 cDNA 扩增，而 A 公司试剂盒进行了 18 个循环的 PCR 扩增。随后，使用 Nextera XT DNA Sample Preparation Kit 进行文库制备，测序使用 illumina MiSeq 仪器。结果显示，与 A 公司的试剂盒相比，GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 可以多检测出大约 5000 个以上的基因。

| Percentage of reads (%) | RamDA-seq™ | | A公司试剂盒 | |
|---|------------|--------|--------|--------|
| Mapped reads | 90.9 | 86.1 | 89.5 | 90.8 |
| rRNA+mitochondria | 24.0 | 23.0 | 9.0 | 9.9 |
| CDS | 27.8 | 26.3 | 41.9 | 41.5 |
| UTR | 16.5 | 15.8 | 21.9 | 22.3 |
| Introns | 16.2 | 14.8 | 9.1 | 9.0 |
| Intergenic regions | 6.4 | 6.2 | 7.6 | 8.0 |
| Number of transcripts TPM [*] >0.1 | 18,984 | 18,465 | 13,500 | 13,721 |
| Number of transcripts TPM [*] >1 | 18,338 | 17,629 | 12,575 | 12,616 |

* 各试剂中，N=2 进行实验，将 read 数标准化并进行分析
* 黄色格子中的数值不是 % 而是个数
* TPM (Transcripts Per Million): 针对各逆转录产物的 read 计数，将基因长度标准化为 1,000bp，并且各样品的总 read 数全部校正为 100 万时的数值。



荧光定量 PCR (qPCR) 试剂选择指导

东洋纺使用 3 种耐热性聚合酶生产出了各种各样的 qPCR 试剂。
根据用途不同进行使用分类可有效地推动实验进程。

| 产品名称 | 类型 | 一步法 | 热启动 | Passive reference | 玻璃毛细管 | 特异性 | 效率 | 长片段扩增 | 高 GC 目的片段 | 粗样品扩增 | 页面 |
|---|-------|-----|-----|-------------------|-------|-----|-----|------------|-----------|-------|------|
| THUNDERBIRD® Next Probe qPCR Mix | Probe | | ✓ | ✓ | ✓ | +++ | +++ | ++ | ++ | + | 1-17 |
| THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix | SYBR® | | ✓ | ✓ | ✓ | +++ | +++ | ++ | ++ | + | 1-17 |
| Realtime PCR Master Mix | Probe | | ✓ | ✓ | ✓ | +++ | ++ | + | + | + | 1-21 |
| SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (-Plus-) | SYBR® | | ✓ | ✓ | ✓ | + | ++ | + | + | + | 1-21 |
| THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix | Probe | | ✓ | ✓ | ✓ | +++ | ++ | + | + | + | 1-19 |
| THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix | SYBR® | | ✓ | ✓ | ✓ | ++ | ++ | + | + | + | 1-19 |
| <i>RNA-direct</i> TM Realtime PCR Master Mix | Probe | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | +++ | ++ | + | ++ | ++ | 1-12 |
| <i>RNA-direct</i> TM SYBR® Green Realtime PCR Master Mix | SYBR® | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ++ | ++ | + | ++ | ++ | 1-12 |
| THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Mix | Probe | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | +++ | ++ | + | ++ | ++ | 1-8 |
| KOD SYBR® qPCR Mix | SYBR® | | ✓ | ✓ | ✓ | ++ | ++ | +++ (<2kb) | +++ | +++ | 1-13 |