

## 「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

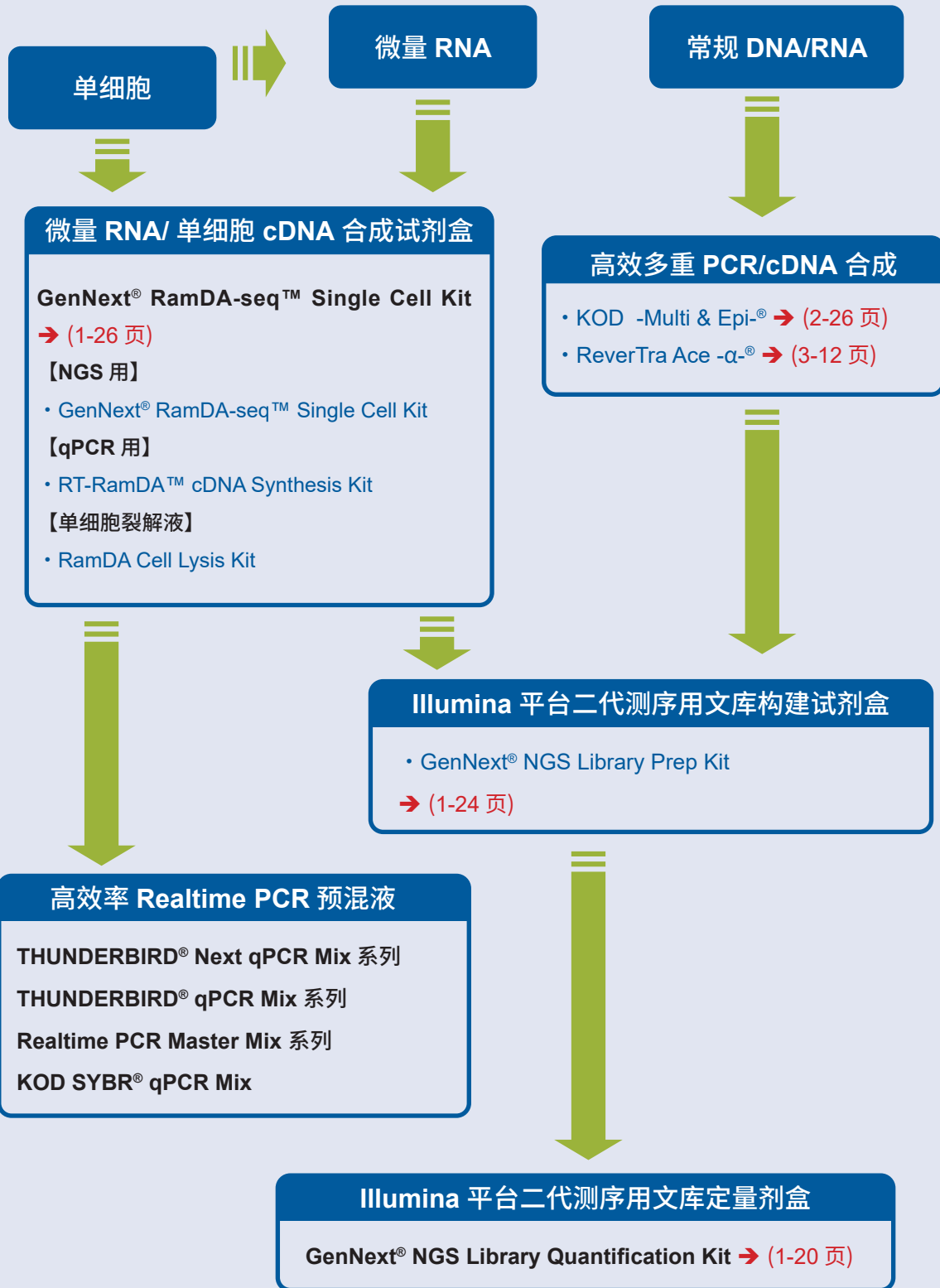
## { 按用途分类的产品流程图 }

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。

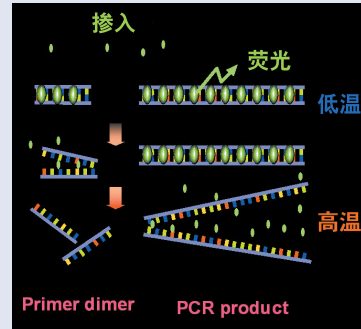


图1 掺入法检测融解曲线测定的原理

### (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法适合于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进行扩增，结果如图3所示。

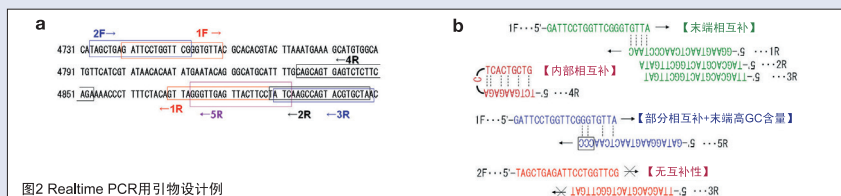


图2 Realtime PCR用引物设计例



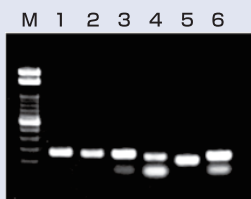


图3 引物序列和引物二聚体的关系

- 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)<sup>+</sup> 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。

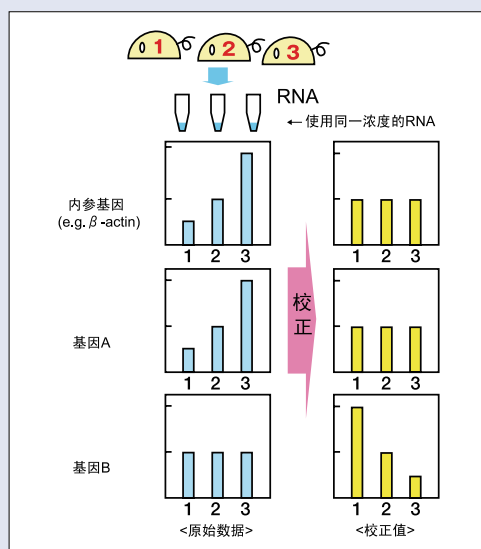


图4 内参的相对定量示意图

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）

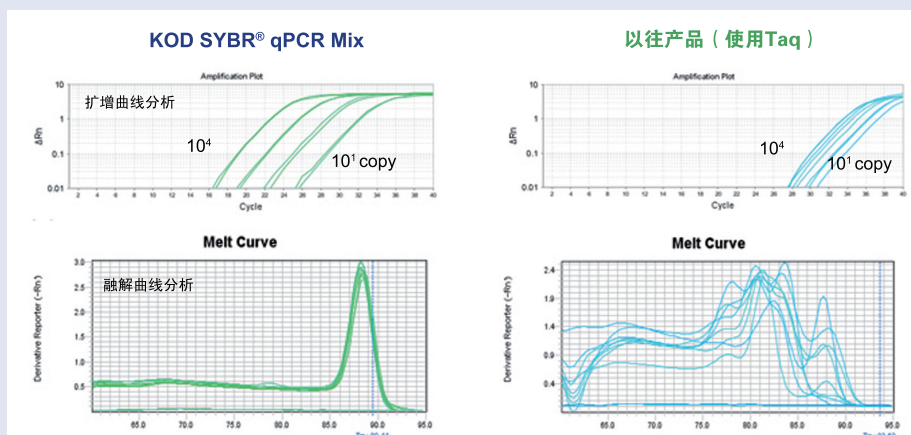
```

CCCGCCGAGAGAGTGACTCTCACGAGAGCGCGAGAGTCAGCTTGGCCAATCCGTG
CGGTCGGCGGCCGCTCCCTTTATAAGCCGACTCGCCCGCAGCGCACCGGGTTCGGG
AGGGTGGGCCTGGGAGGGGTGGTGGCCATTTTTGTCTAACCTAACTGAGAAGGGC
GTAGGCGCCGTGCTTTTCTCCCGCGCGGCTGTTTTTCTCGCTGACTT
    
```

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。

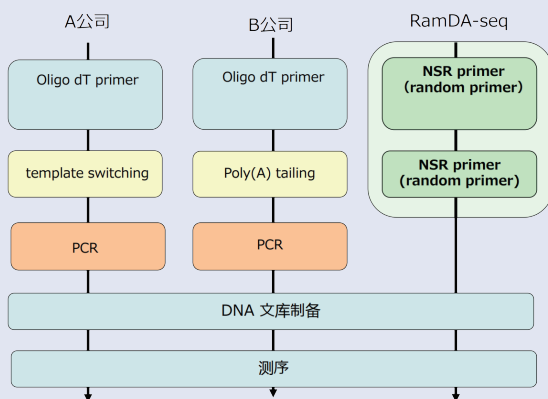
多重 PCR 是样品前处理的重要方式，常见于 SNP 检测、靶向测序等的序列扩增环节。专用的 KOD -Multi & Epi<sup>®</sup> 高保真 PCR 聚合酶能保证各靶序列均一扩增，从源头保证测序的准确性。

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<sup>®</sup> RamDA-seq<sup>™</sup> 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<sup>®</sup> 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。



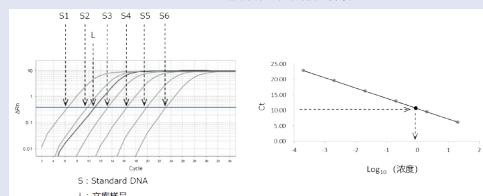
RNA 建库技术的比较

### 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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。

$$\text{文库浓度 (nM)} = \frac{[\text{计算出的文库样本的浓度}] \times 452 \text{ bp (Standard DNA 片段长度)} \times \text{稀释倍数}}{1000 \times [\text{文库样品平均片段长度 bp}]}$$



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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 是 Idaho Technology Inc. 的商标。

TaqMan<sup>®</sup> 是 Roche Molecular Systems Inc. 的注册商标。

## → 特征

### ① 迅速·高灵敏度

通过使用 TaqMan<sup>®</sup> 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

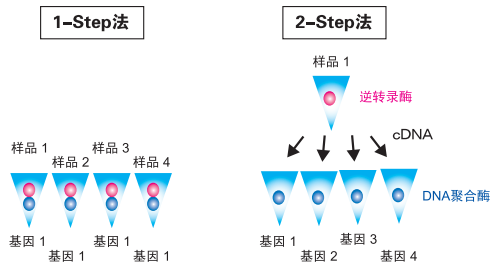
可通过添加 UNG, 防止因 carryover 污染导致的假阳性。

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

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

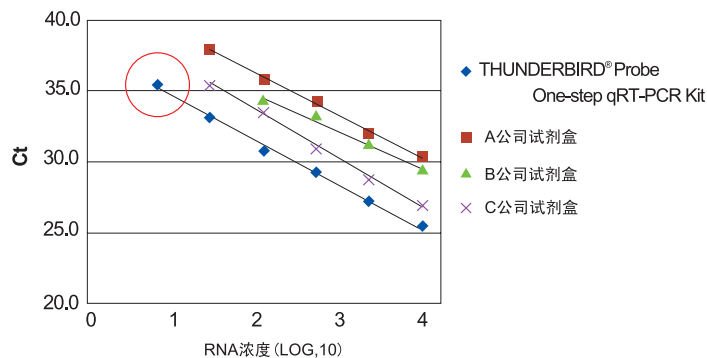
## → 结果示例

### 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，才能检测到 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 <sup>*1</sup> )	1/0.1 μl
RNA 溶液	Y μl
总体积	50 μl

<sup>\*1</sup> 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.<sup>\*2</sup>)

50°C, 10min.

95°C, 1min.

95°C, 15sec.

60°C, 45sec. } 40~45 cycles

<sup>\*2</sup> 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。

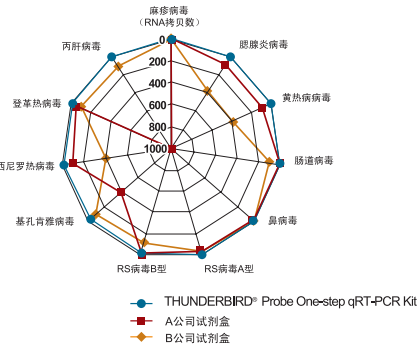


## 2 各种病毒检测灵敏度的比较

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 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、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)。

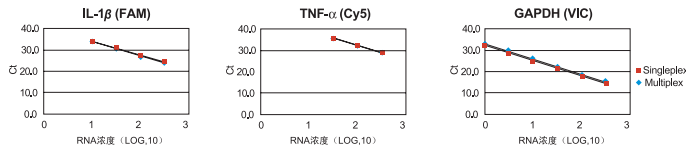


图1 单独检测 (Singleplex) 的结果  
各目的基因单独检测的结果。为了与图2多重荧光检测 (Multiplex) 的结果相比较作成了图。

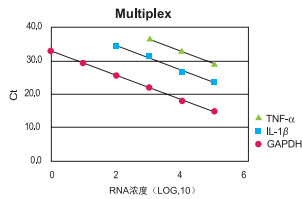


图2 多重荧光检测的结果

表1 多重荧光检测 (Multiplex) 与单独检测 (Singleplex) 的PCR效率与相关系数的比较

	IL-1 $\beta$		TNF- $\alpha$		GAPDH	
	PCR效率	R <sup>2</sup>	PCR效率	R <sup>2</sup>	PCR效率	R <sup>2</sup>
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

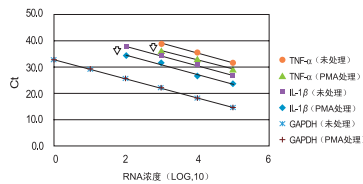


图3 通过多重荧光检测表达分析的结果

将HeLa S3细胞铺于6孔板中，每孔 $4 \times 10^5$ 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 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、GAPDH基因的表达量进行分析。

结果显示，通过PMA处理，IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 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 <sup>5</sup>	-
2	-	-	-	-
3	+	+(A)	8.1 × 10 <sup>4</sup>	-
4	+	+(A)	2.7 × 10 <sup>5</sup>	-
5	-	+(A)	9.6 × 10 <sup>2</sup>	-
6	-	+(A)	3.6 × 10 <sup>3</sup>	-
7	+	+(A)	2.3 × 10 <sup>6</sup>	-
8	-	-	-	-
9	+	+(A)	1.5 × 10 <sup>5</sup>	-
10	+	+(A)	6.7 × 10 <sup>5</sup>	-
11	-	-	-	-
12	+	+(A)	1.6 × 10 <sup>5</sup>	-
13	+	+(A)	9.4 × 10 <sup>3</sup>	-
14	-	+(A)	9.5 × 10 <sup>3</sup>	-
15	+	+(A)	3.9 × 10 <sup>3</sup>	-
16	+	+(A)	2.4 × 10 <sup>5</sup>	-
17	-	-	-	-
18	-	+(A)	4.2 × 10 <sup>4</sup>	-
19	-	+(A)	3.4 × 10 <sup>2</sup>	-
20	-	+(B)	-	9.6 × 10 <sup>3</sup>

#### → 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) <sub>2</sub>	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) <sub>2</sub>	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.	} 45cycles
55~65°C	15sec.	
74°C	45sec.	

※ 退火温度请根据引物的 T<sub>m</sub> 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 Mn<sup>2+</sup> 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)**

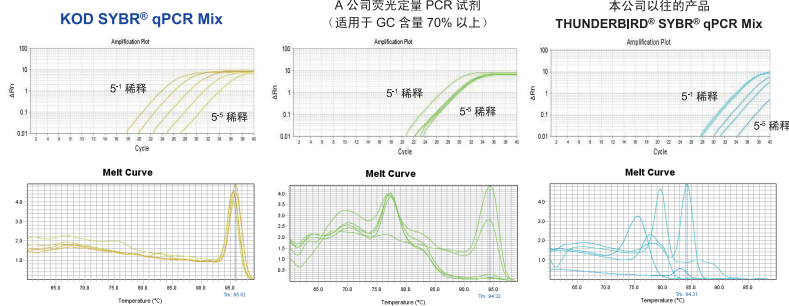


图 1. 针对于 GC-rich 目的片段的荧光定量 PCR (使用 ABI StepOne Plus™)

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)**

**CCCGCCCGAGAGAGTGACTCTCACGAGAGCCGCGAGAGTCACTTGGCCATCCGTGCGGTGCGCGGCCGCTCCCTTATAAGCCGACTCGCCCGGAGCGCACCGGGTTGCGGAGGGTGGGAGGGGTGGTGGCCATTTTTGTCTAACCTTAAGTGAAGGGCGTAGGCGCGTCTTTTCTCCCGCGCGCTGTTTTCTCGGTGACTT**

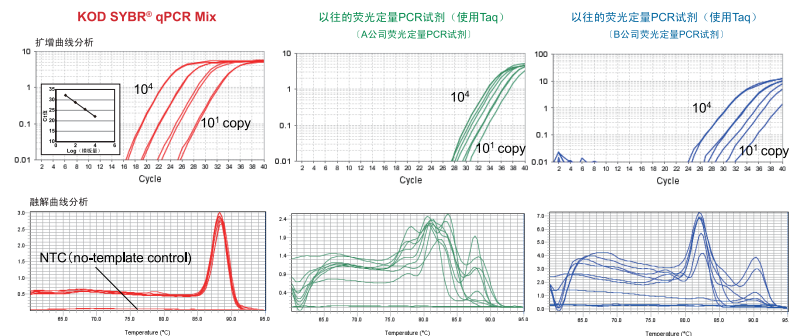


图 2. 针对于 GC 含量有偏差的启动子区域的荧光定量 PCR (使用 ABI StepOne Plus™) 已确认本试剂也适用于易形成二级结构的目的片段。

#### 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。

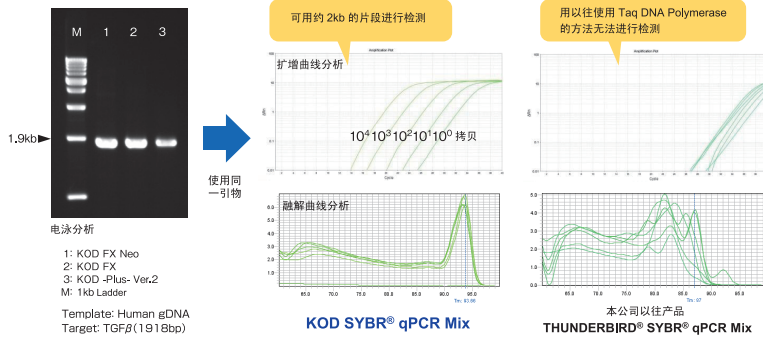


图 3. 针对长链目的片段的荧光定量 PCR (使用 ABI StepOne Plus™)

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。

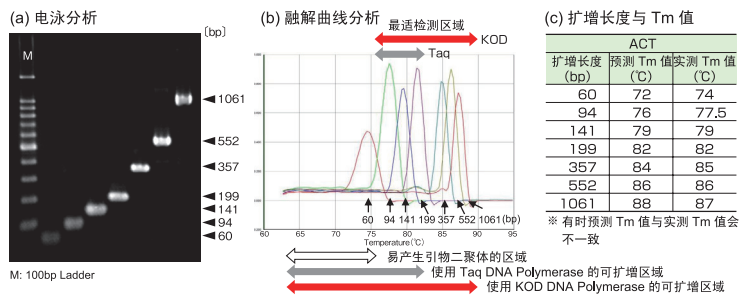


图 4. 使用扩增长度不同的目的片段进行分析 (使用 ABI 7500)

以人基因组 DNA 为模板对  $\beta$ -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)。

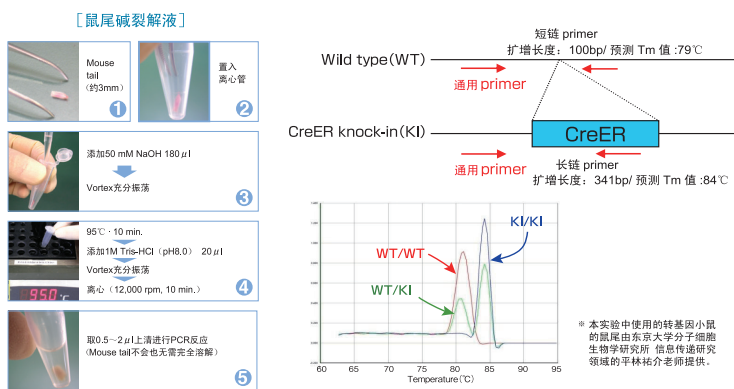


图 5. 应用融解曲线分析在单管中进行小鼠基因分型 (使用 ABI 7500)

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 $\mu$ l
qPCR Mix	10 $\mu$ l
Forward Primer	4 pmoles
Reverse Primer	4 pmoles
50 $\times$ ROX reference dye	0.4/0.04 $\mu$ l*
DNA 样品	Y $\mu$ l
Total Volume	20 $\mu$ 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	
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)。

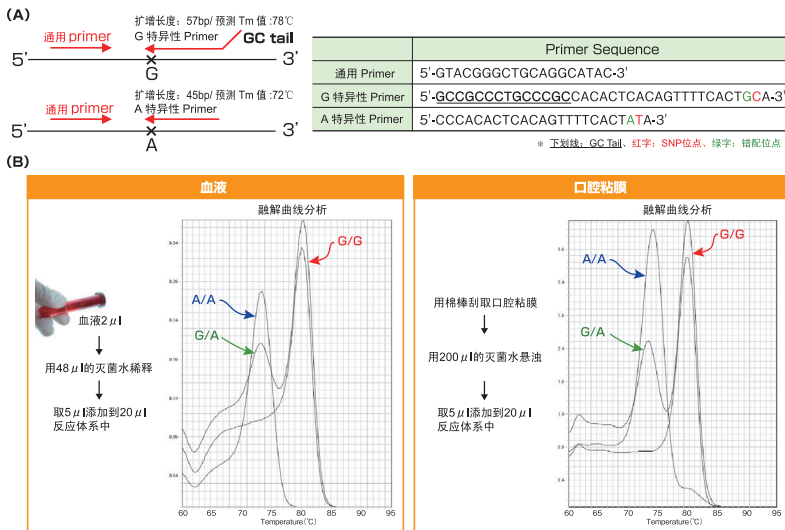


图 6. 血液及口腔粘膜的检测 (使用 ABI 7500 Fast)

(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用本试剂进行分析。

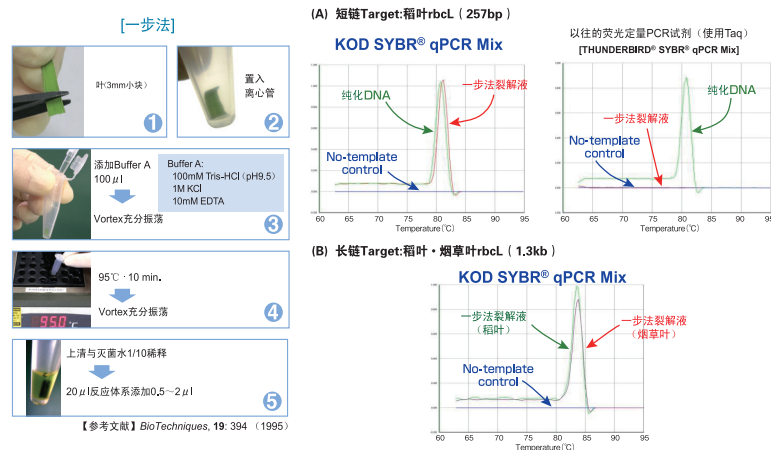


图 7. 粗样品的荧光定量 PCR 检测 (使用 ABI 7500)

(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。

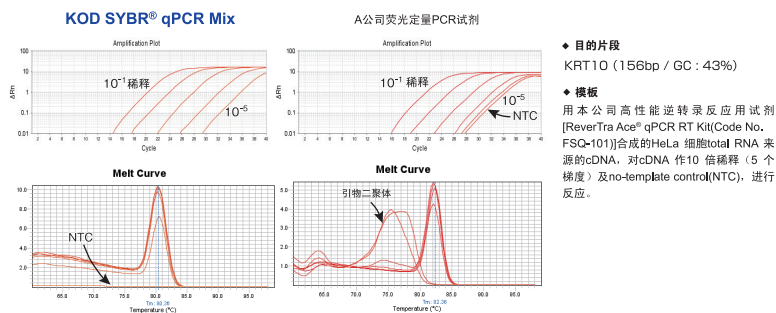


图 8. 与其他公司荧光定量 PCR 试剂的反应特异性比较。(使用 ABI StepOnePlus™)

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 <span style="color: blue;">Coming soon</span>		
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。

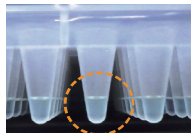
### ⑥ 可使用 UNG (防污染)

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 / Dicell / 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:

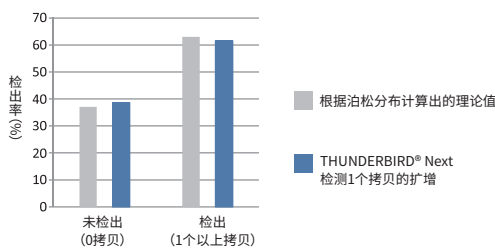
SYBR® 是 Molecular Probes Inc. 的注册商标。  
TaqMan® 是 Roche Molecular Systems Inc. 的注册商标。

## → 结果示例

### 1 SYBR® Green I 检测体系 1 个拷贝的扩增确认

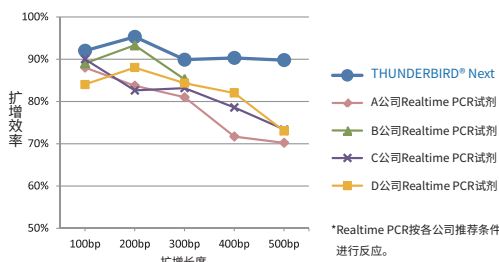
扩增 1 个拷贝的目的片段时，可认为 1 个拷贝的检测数与泊松分布的设定检测数相同。泊松分布的理论值中，0 拷贝的概率为 37%、1 个以上拷贝的概率为 63%。

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  $\Delta Ct$  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)	$\Delta Ct$	目的片段	Ct值 (新制备的)	Ct值 (48hr后)	$\Delta Ct$
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)	$\Delta Ct$	目的片段	Ct值 (新制备的)	Ct值 (48hr后)	$\Delta Ct$
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 $\mu$ l
qPCR Mix	10 $\mu$ l
Forward Primer	6pmoles
Reverse Primer	6pmoles
UNG [Code No. UNG-101]	0.4U*
DNA 样品	Y $\mu$ l
Total Volume	20 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

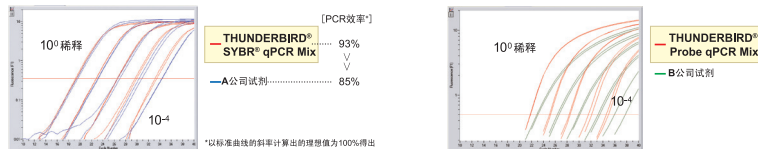
## → 特征

### 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。

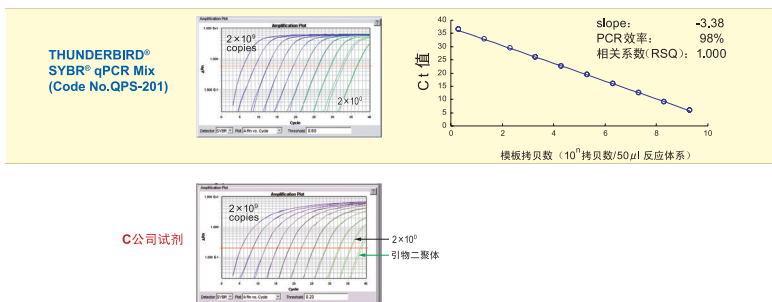


通过 SYBR® Green I 检测体系对 Norovirus GI cDNA 的检测 (使用缩合引物)  
 (使用 Roche Diagnostics LightCycler® 1.1)

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。

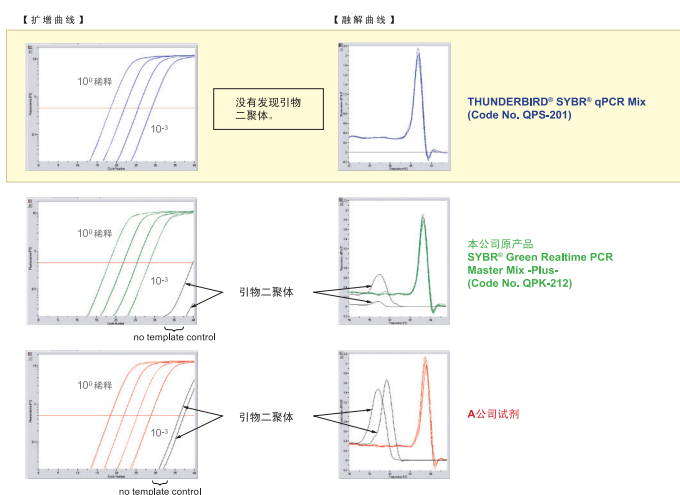
添加量不应超过总反应体系的 10%。使用公司产品 ReverTra Ace qPCR RT Kit 系列(→ 3-8 页), 可添加最多至 20% 的液量。

#### → 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  $\beta$ -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 $\mu$ l
qPCR Mix	10 $\mu$ l
Forward Primer	6pmoles
Reverse Primer	6pmoles
50 × ROX reference dye	0.4/0.04 $\mu$ l*
DNA 样品	Y $\mu$ l
Total Volume	20 $\mu$ l

\*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

##### <2 步法 PCR>

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

##### <3 步法 PCR>

95°C,	20~60sec.	
↓		
95°C,	1~15sec.	40 cycles
55~65°C,	5~30sec.	
72°C,	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	SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-
Code: QPK-101	Code: QPK-201	Code: QPK-212
1ml × 5支	1ml × 5支	1ml × 5支
¥1,500	¥1,500	¥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:

<b>&lt;QPK-101, QPK-201&gt;</b>	
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)	
<b>&lt;QPK-212&gt;</b>	
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 20 $\mu$ l 反应体系时的使用次数。

## 产品内容:

### <KOD SYBR® qPCR Mix> \*

- KOD SYBR® qPCR Mix
- 50 $\times$ ROX reference dye

### <Standard & Primer Set>

- Standard DNA 1 ~ 6\*\*
- 5 $\times$ Primer mix
- 50 $\times$ 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。

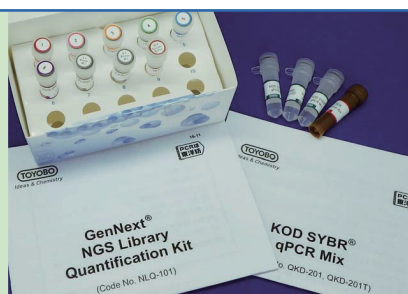
## 保存:

-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。

## 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. <sup>*1</sup>	← 35cycles
98°C, 10sec.	
65°C, 10sec.	
68°C, 30sec. <sup>*2</sup>	

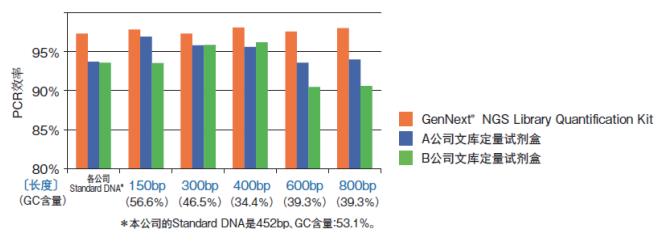
\*1 本产品因为使用了抗体，采用了热启动体系，所以请进行 98°C, 2min. 的预变性，使抗体失活。

\*2 600bp 以上的文库时，请设定为 45 sec.

## → 实验例

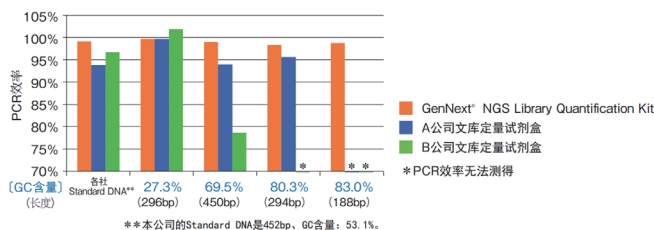
### ① 各种长度的目的片段的 PCR 效率

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。



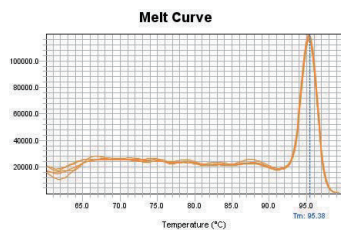
### ② 各种 GC 含量的目的片段的 PCR 效率比较

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。

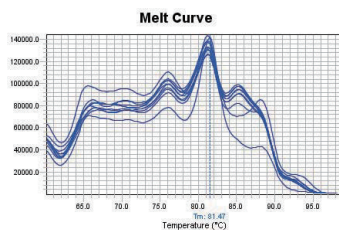


## 【GC 含量 83.0% 的目的基因的融解曲线】

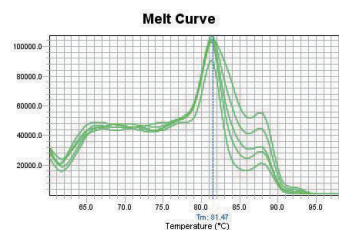
### GenNext® NGS Library Quantification Kit



### 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

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

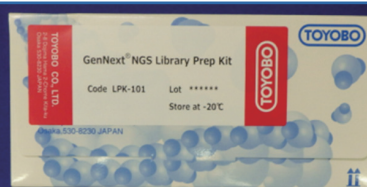
# GenNext<sup>®</sup> NGS Library Prep Kit

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<sup>®</sup> NGS Library Prep Kit 可从片段化的双链 DNA 或 PCR 产物开始，制备 Illumina<sup>®</sup> 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<sup>®</sup>、TruSeq<sup>™</sup> 是 Illumina Inc. 的注册商标。

MultiNA<sup>®</sup> 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

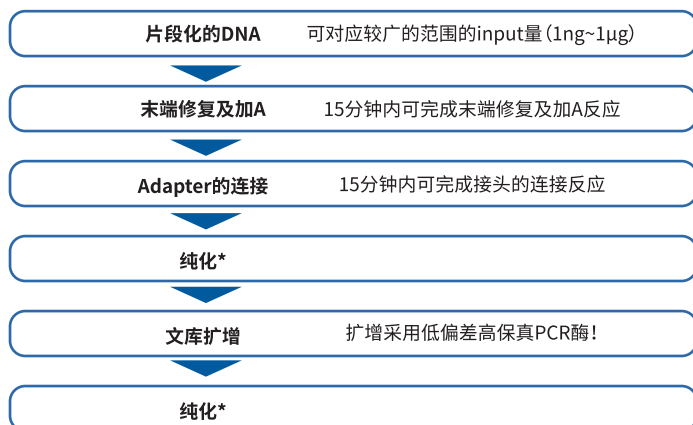
对应较广范围的 input 量 (1ng ~ 1μg) 进行的设计。

### 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



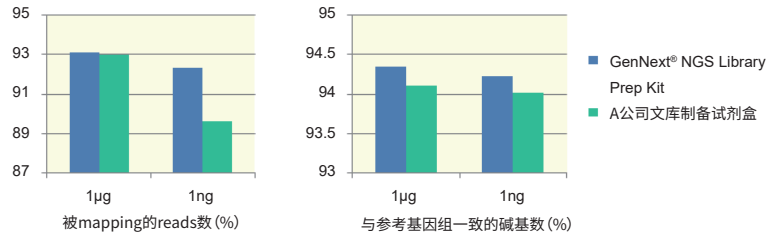
\*本产品中不含有Adapter与纯化用磁珠。

## → 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 $\mu$ 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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。

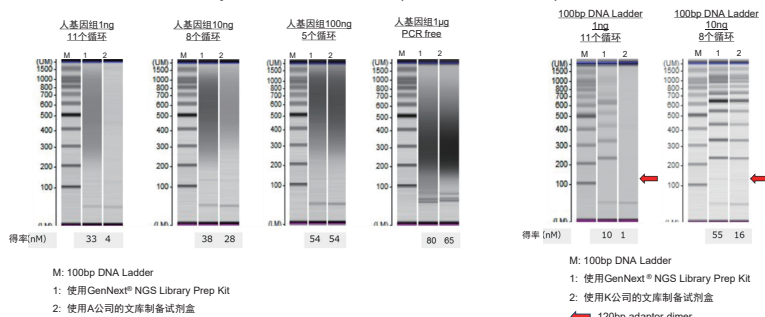


### ② 文库得率及分布的比较

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 $\mu$ g、以及 100bp DNA Ladder 1、10ng 开始, 使用 GenNext<sup>®</sup> 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 $\mu$ 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<sup>®</sup> (岛津生产公司) 的产品进行确认。文库的得率用 GenNext<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> NGS Library Prep Kit 和 A 公司试剂时, 结果相同; 低 input 量时, 使用 GenNext<sup>®</sup> 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 <sup>®</sup> 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。

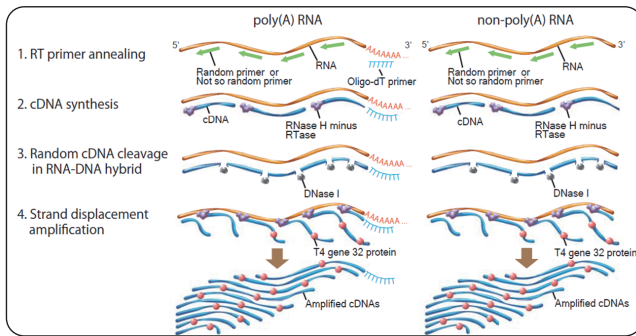
### ④ 相比原来技术, 检测到的基因数大大提高了

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。

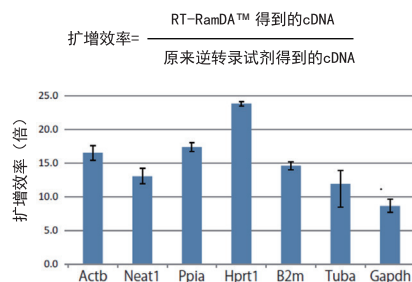
\*NSR 是 Not so random 的缩写, NSR 引物是指为抑制 rRNA 逆转录成 cDNA, 利用计算机算法将 18S, 28S RNA 相关的序列剔除后的随机引物。建议 NSR Primer Set for human (NSR-101) 用于人源样本, NSR Primer Set for mouse(NSR-102) 用于鼠源样本。



## → 实验例

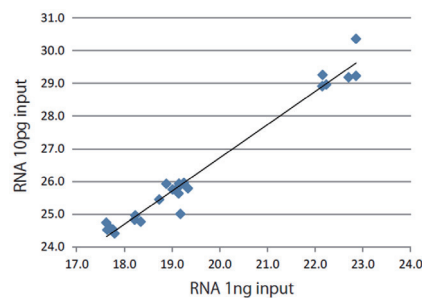
### 1 cDNA 扩增效率的验证

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。



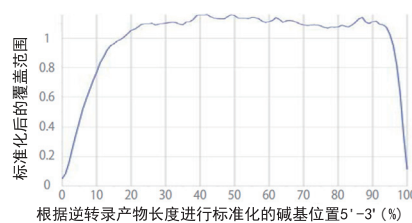
### 2 input RNA 使用量的验证

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

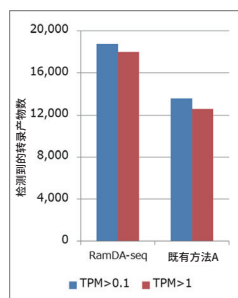
以 10pg mES total RNA 开始，使用 GenNext® RamDA-seq™ Single Cell Kit 制备 cDNA，合成双链 DNA 后构建文库，使用 illumina MiSeq 仪器进行 NGS 分析。结果显示，制备的文库基本覆盖了全部基因。



### 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	18,984	18,465	13,500	13,721
TPM <sup>*</sup> >0.1	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> <sup>TM</sup> Realtime PCR Master Mix	Probe	✓	✓	✓	✓	+++	++	+	++	++	1-12
<i>RNA-direct</i> <sup>TM</sup> 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