



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
 订货热线: 400-1683301或800-8283301  
 订货e-mail: order@beyotime.com  
 技术咨询: info@beyotime.com  
 网址: http://www.beyotime.com

## BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit (防污染型)

产品编号	产品名称	包装
D7528S	BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit (防污染型)	100次
D7528M	BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit (防污染型)	500次

### 产品简介:

- 碧云天的BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit (防污染型), 即BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit (UDG), 是一种基于TaqMan等探针的用于一步法反转录实时荧光定量PCR, 即qRT-PCR (Quantitative Reverse Transcription PCR)或real-time RT-PCR的新型高品质防污染(Carryover prevention)试剂盒, 主要用于RNA的特异性超高灵敏度定量检测。本产品含有优化比例的高品质UDG酶和dUTP, 可有效消除PCR扩增过程中带来的产物污染问题造成的假阳性或CT值偏低。由于使用的探针一般是TaqMan探针, 所以本方法也常称作防污染型TaqMan探针法。
- UDG (Uracil-DNA Glycosylase), 也称UNG (Uracil-N-glycosylase), 可催化含尿嘧啶的DNA链中的尿嘧啶(dU)碱基和脱氧核糖之间的N-糖苷键发生水解, 从而释放游离尿嘧啶, 主要应用于消除PCR扩增过程中带来的产物污染问题。其防止污染的原理为: 在PCR反应中加入适量的dUTP, 以dUTP替代dTTP掺入DNA中, 形成含dU碱基的PCR扩增产物; 后续进行PCR反应时, 使用UDG酶选择性切割可能被污染而带入的之前PCR扩增产生的含有dU的单链或双链DNA, 从而避免之前的PCR扩增产物可能的污染对于本次PCR扩增带来的负面影响。
- BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit (防污染型)以提取的RNA为模版, 使用qPCR引物在同一反应管内连续进行反转录和荧光定量PCR, 操作简单快速, 最大限度地减少人为误差, 有效降低污染风险, 节约PCR实验的操作时间, 检测通量大。
- 本产品整合了高效的BeyoRT™ M-MuLV Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor和优异的抗体结合型热启动BeyoFast™ Taq DNA Polymerase, 并优化了缓冲体系, 反转录性能优、检测灵敏度高、扩增特异性强、反应稳定性好, 非常适合于内源低丰度RNA、外源病毒RNA等微量RNA的检测。
- 检测原理: 探针法qPCR不使用荧光染料如SYBR Green等对PCR产物进行荧光染色, 而是采用了荧光基团和淬灭基团(quencher)标记的DNA探针靶向拟通过PCR检测的目标序列(设计的探针结合位点通常位于两条引物结合位点之间)。正常情况下, 探针上的淬灭基团由于空间上的荧光共振能力转移(FRET)而导致荧光基团淬灭。在PCR反应扩增目标序列时, 引物和探针都会退火到目标基因上, 随着引物的延伸, Taq酶的5'→3'外切酶活性会导致结合在目标序列上的探针从5'端开始逐渐被降解。探针的荧光基团和淬灭基团被Taq酶切开后, 淬灭基团的作用消失, 荧光基团就能正常地被激发光所激发而产生荧光了。每经过一个PCR循环, 就会有更多的荧光基团被释放, 荧光强度与新合成的目标片段数量成正比, 从而就可以实现定量检测了。探针通常是目标序列特异性的一段线性DNA, 5'端标记FAM或HEX等荧光基团, 3'端标记BHQ1、TAMRA或MGB等荧光淬灭基团。
- 本产品的特异性好、灵敏度高: 特异性并不仅仅依赖于PCR引物, 探针和目标基因发生特异性的结合和降解, 才能生成荧光信号, 检测灵敏度和特异性通常要显著高于使用SYBR Green等荧光染料的方法。
- 本产品可用于多重检测: 单个反应孔中, 不同基因对应不同探针, 不同探针对应不同荧光标记, 即可进行多重荧光定量PCR检测。经测试, 在适当优化引物和探针后, 本产品可同时用于2-3个基因的检测。
- 本产品使用的BeyoFast™ Taq DNA Polymerase是一种与抗体结合的高品质热启动酶, 能够实现便捷高效的热启动。BeyoFast™ Taq DNA Polymerase中的Taq酶与抗Taq酶的单克隆抗体相互结合, 从而抑制了Taq酶的DNA聚合酶活性, 这样可以有效避免在低温条件下由引物和模板DNA非特异性退火或引物二聚体引起的非特异性扩增。在PCR反应的预变性步骤中抗体会被加热失活, 这样可以确保仅在预变性后才会把Taq酶的活性释放出来, 预变性之前不会发生DNA聚合反应, 从而大大提高了PCR反应的特异性、灵敏度和定量检测的准确性。
- 本产品包含了BeyoRT™ M-MuLV Reverse Transcriptase、BeyoFast™ Taq DNA Polymerase、UDG酶、PCR Buffer、dNTPs、dUTP、稳定剂、Nuclease-free Water、ROX (根据不同荧光定量PCR仪进行选择)和镁离子等所有的通用组分, 使操作更简单、使用更便捷。用户只需自备引物、探针和样品RNA即可。
- 本产品提供了Low ROX和High ROX, 广泛兼容于无需ROX和需要Low ROX或High ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪。ROX的作用是用于校正与PCR无关的荧光波动, 从而最大限度减少孔间差异。这种差异可能由多种因素引起, 如移液误差及样品蒸发等。不同的荧光定量PCR仪对ROX的要求不同, 请根据实际所用仪器在配制反应体系时选择高浓度ROX (High ROX)、低浓度ROX (Low ROX)或不加ROX Probe。Probe常用仪器所需ROX类型请参考如下表格。

添加ROX类型	适用PCR仪
不需添加	Bio-Rad: CFX384, CFX96, .MiniOpticon, iCycler IQ, MyiQ and iQ5; Eppendorf: Mastercycler ep realplex and realplex2 s; Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 6000; Roche LightCycler 480; Cepheid SmartCycler; Illumina Eco qPCR

Low ROX	ABI: 7500(Fast), ViiA 7, QuantStudio 6 and 7 Flex Systems; Stratagene: Mx3000P, Mx3005P and Mx4000; Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 3000; Bio-Rad/MJ: Chromo4, Opticon 2 and Opticon
High ROX	ABI GeneAmp 5700; ABI PRISM 7000, 7700; ABI 7300, 7900HT(Fast); ABI StepOne(Plus)

- 如果用于常规的96孔板qRT-PCR检测(建议反应体系为20 $\mu$ l), 本产品小包装D7528S可以进行100次检测, 中包装D7528M可进行500次检测; 如果用于常规的384孔板qRT-PCR检测(建议反应体系为10 $\mu$ l), 本产品小包装D7528S可以进行200次检测, 中包装D7528M可进行1000次检测。

#### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7528S-1	Probe One-Step Enzyme Mix (20X, UDG)	100 $\mu$ l
D7528S-2	Probe One-Step Reaction Buffer (2X)	1ml
D7528S-3	Nuclease-free Water	1ml
D7528S-4	Low ROX (50X)	40 $\mu$ l
D7528S-5	High ROX (50X)	40 $\mu$ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7528M-1	Probe One-Step Enzyme Mix (20X, UDG)	0.5ml
D7528M-2	Probe One-Step Reaction Buffer (2X)	5ml
D7528M-3	Nuclease-free Water	5ml
D7528M-4	Low ROX (50X)	200 $\mu$ l
D7528M-5	High ROX (50X)	200 $\mu$ l
—	说明书	1份

#### 保存条件:

-20 $^{\circ}$ C避光保存, 两年有效。尽量避免反复冻融。

#### 注意事项:

- 探针的荧光标记须根据所使用的qPCR仪荧光兼容性来确定。对于需要ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪, 避免使用ROX标记探针。
- 用于多重检测时, 需要适当优化引物和探针, 并使用适当的不同荧光基团标记探针, 确定效果后再进行多重检测, 一般建议不超过三重检测。如果用于三重或四重检测, 推荐碧云天的BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, 防污染型) (D7523)。
- 请注意避免RNase污染, 使用RNase-free的枪头、离心管等。
- Probe One-Step Enzyme Mix (20X, UDG)含有高浓度甘油, 粘度高, 使用前将短暂离心至管底, 并用移液器轻轻混匀, 混匀过程中尽量避免产生气泡, 然后缓慢准确吸取。
- 使用前需确保Probe One-Step Reaction Buffer (2X)完全融化, 上下颠倒轻轻混匀后使用。
- 如果扩增片段较长或者RNA结构较为复杂, 可将模板RNA在65 $^{\circ}$ C预处理5-10分钟, 可提高反转录效率。
- 本反应使用qPCR的Reverse Primer作为反转录的基因特异性引物, 不能使用Random Hexamer Primer或Oligo(dT) Primer等常用于cDNA第一链合成的引物。
- 注意引物退火温度, 当退火温度<60 $^{\circ}$ C时, 推荐使用三步法PCR扩增。
- 对于超过350bp或者高GC含量的扩增片段, 建议增加延伸时间至60秒或者采用三步法以提高扩增效率。
- 经测试, 本产品反复冻融10次对使用效果无显著影响。但仍需尽量避免反复冻融本产品, 反复冻融可能使产品性能下降。
- qPCR检测是超高灵敏度的检测, 尽管本产品有很好的防污染效果, PCR反应设置区域还是需尽量避免各种可能的待扩增产物的污染。PCR产物宜密封后丢弃, 以避免超高浓度的PCR产物污染实验环境。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明:

##### 1. One-Step qRT-PCR反应体系的设置:

- 融解并混匀One-Step qRT-PCR反应所需的各种溶液, 置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在室温或冰浴上设置One-Step qRT-PCR反应体系(以96孔板, 每孔反应体系为20 $\mu$ l为例):

Reagent	Volume	Final Concentration
---------	--------	---------------------

Probe One-Step Reaction Buffer (2X)	10µl	1X
Probe One-Step Enzyme Mix (20X, UDG)	1µl	1X
Forward and Reverse Primer Mix (3µM each)	2µl	300nM
Probe	0.5µl	200nM
Template RNA	2µl	1pg-2µg
Without or Low/High ROX (50X)	0.4µl	1X
RNase-Free Water	Up to 20µl	-

**注1:** 当检测样品比较多时, 可根据样品数量先配制所需的相同试剂的混合液, 一般多配制5-10%, 然后再分装到每个反应孔中, 最后再在每个反应孔中加入不同的试剂, 这样可使所取的试剂体积更准确更均一, 误差更小, 并减少试剂损失。例如: 检测的目的RNA相同, 而RNA样品不同, 则可以把除RNA样品外的所有试剂根据样品数量配制在一起, 然后分液至每个反应孔中, 最后再加入不同的模板RNA。

**注2:** 通常引物的终浓度为0.2-0.5µM时可获得良好的检测效果, 也可根据情况在0.1-1.0µM范围内调整引物的终浓度。为了获得理想的qPCR的效果, 扩增片段的长度建议为80-200bp。

**注3:** 最佳的探针(probe)浓度, 与使用的荧光定量PCR仪、探针种类、荧光标记物质种类有关。实际使用时请参考仪器说明书, 或各荧光探针的具体使用要求进行探针浓度的调节。通常探针的浓度宜低于引物的浓度, 例如引物终浓度为0.3µM, 则推荐的探针终浓度为0.2µM, 可在0.1-0.3µM范围内调整探针的终浓度。

**注4:** 通常RNA模板的量以1pg-2µg为参考用量, 一般总RNA为100ng-1µg。因不同物种的模板中含有RNA的拷贝数不同, 如有必要, 可对模板RNA进行梯度稀释, 以确定最佳的模板RNA使用量。同时, 由于qPCR灵敏度极高, 建立反应体系时加入RNA模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响, 因此建议将模板RNA适当稀释后加入反应体系中, 比如每个20µl反应体系2-5µl, 这样可以有效提高实验的重复性。

**注5:** 不同的荧光定量PCR仪对ROX的要求不同, 请根据实际所用仪器在配制反应体系时选择高浓度ROX (High ROX)、低浓度ROX (Low ROX)或不加ROX。

**注6:** 96孔板的推荐反应体系为20µl, 也可以根据实际实验需求, 按比例扩大或缩小反应体系。

**注7:** 建议设置不加模板RNA的阴性对照组。

- c. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀, 室温离心数秒, 使液体聚集于管底。
- d. 将设置好的PCR反应管或PCR反应板置于荧光定量PCR仪上, 开始PCR反应。

## 2. One-Step qRT-PCR反应程序:

50°C 10分钟一般可以得到理想的反转录效果, 但如果片段较长, 也可以适当增加。在Real-time PCR反应前进行模板的预变性, 通常设定为94°C 2分钟, 复杂或高GC模板适当延长时间至5分钟。本产品中的BeyoFast™ Taq DNA Polymerase可以在15秒内可完成至少300bp的扩增, 可以满足绝大多数的qPCR实验; 对于超过350bp或者高GC含量的扩增子, 建议增加延长时间至60秒或者采用三步法以提高扩增效率。建议采用如下的PCR程序, 本程序是以ABI QuantStudio™ 6 Flex荧光定量PCR仪为例:

- a. UDG酶: 37°C 5min
- b. 反转录: 50°C 10min
- c. 预变性: 94°C 2min
- d. 变性: 94°C 15sec
- e. 退火/延伸: 60°C 15-30sec
- f. 重复步骤d和步骤e, 总共35-45个循环
- g. 使用荧光定量PCR仪提供的软件分析结果

三步法只需在退火/延伸后加一步72°C 30sec, 随后重复步骤d、e及增加的这一步骤共35-45个循环即可。

**注1:** 复杂模板反转录温度可升高至55-60°C, 以提高反转录效率。

**注2:** 以上举例为常规qPCR反应系统, 仅供参考。实际反应条件因仪器、模板、引物等的结构不同而异, 需根据模板、引物、目的片段的特点设定最佳反应条件, 并根据比例放大或缩小反应体系。

## 常见问题:

### 1. 荧光定量PCR结果不理想, 出现特异性不好或扩增效率不高时, 可能是由于以下原因造成:

- a. 样品RNA发生降解。此时可以通过RNA电泳等方法确认所使用的RNA样品是否发生明显的降解, 在反转录实验前的实验操作过程中需要严格注意无RNA酶的实验操作。
- b. 引物设计不佳。请选择适当的引物设计软件进行引物设计, 注意引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。也可以尝试使用有文献报道使用过的引物, 或者从碧云天订购经过测试的qPCR引物。
- c. 待扩增片段GC含量偏高。GC含量较高的情况下PCR会变得相对比较困难, 此时宜更换引物。
- d. PCR反应体系在室温设置时容易导致非特异性条带, 但在启动热启动酶时可以有效避免室温操作导致的非特异性条带的产生。但对于一些较难扩增的产物, 可以尝试在冰浴上设置PCR反应体系, 以进一步减少非特异性的DNA扩增。
- e. 退火温度不佳, 需要优化。这种情况下宜更换引物。
- f. 待扩增片段GC含量较高或长度较长, 变性不够充分。此时宜更换引物, 使待扩增片段的GC含量和长度适中。
- g. 模板量太低, 此时宜适当加大模板量。
- h. 模板中含有抑制PCR反应的物质, 可以用适当的DNA纯化方法例如柱纯化等纯化模板DNA。

## 2. 反应条件优化方法:

- 引物浓度: 通常引物终浓度为0.2 $\mu$ M时可获得良好检测效果, 终浓度可以在0.1-1.0 $\mu$ M范围内适当调整。如果希望提高反应特异性, 可降低引物浓度; 如果希望提高扩增效率, 可增加引物的浓度, 从而优化反应体系。
- 退火温度: 建议采用两步法PCR, 退火温度60 $^{\circ}$ C进行反应。如果希望提高反应特异性, 可提高退火温度, 以60-64 $^{\circ}$ C作为退火温度的调整范围。在引物Tm值较低而得不到良好的实验结果时, 可尝试进行三步法PCR扩增, 三步法的退火温度请以56-64 $^{\circ}$ C作为温度设置的参考范围。
- 延伸时间: 建议采用两步法PCR, 延伸15-30秒。对于超过350bp或者高GC含量的扩增子, 建议增加延伸时间至60秒或者采用三步法以提高扩增效率。

## 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7260-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X)	1/5/25ml
D7262-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Low ROX)	1/5/25ml
D7265-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, High ROX)	1/5/25ml
D7268S/M	BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit	100/500次
D7271-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X)	1/5/25ml
D7272-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, Low ROX)	1/5/25ml
D7273-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, High ROX)	1/5/25ml
D7277S/M	BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit	100/500次
D7501-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, 防污染型)	1/5/25ml
D7503-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Low ROX, 防污染型)	1/5/25ml
D7507-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, High ROX, 防污染型)	1/5/25ml
D7509S/M	BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (防污染型)	100/500次
D7512-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)	1/5/25ml
D7515-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, Low ROX, 防污染型)	1/5/25ml
D7518-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, High ROX, 防污染型)	1/5/25ml
D7523S/M/L	BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)	100/500/2500次
D7528S/M	BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit (防污染型)	100/500次
FASA011-1pc	BeyoGold™封板膜刮板	1个/袋
FSF002	荧光定量PCR用封板膜(ABI分装)	20片/包装
FSF035-100pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型)	100片/包装
FSF039-20pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装)	20片/包装
FSF039-100pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装)	100片/包装
FTUB325-1box	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明)	125排/盒
FTUB325-10bxs	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明)	125排/盒, 10盒/箱
FTUB333	荧光定量PCR用96孔板(ABI原装)	20个/包装
FTUB384	荧光定量PCR用384孔板(ABI分装)	20个/包装
FTUB335-1box	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒
FTUB335-5bxs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB337-1box	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒
FTUB337-5bxs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱

Version 2023.12.15