

产品索引	420
中文名称:	荧光定量 PCR 反应液
英文名称:	[SYBR® Green Realtime PCR Master Mix
产品编号:	QPK-201
产品类别:	分子生物学
生产厂家:	TOYOBO
产品价格:	1100 元 优惠价格:950.0 元
产品规格:	200 次
产品说明:	

Realtime PCR Master Mix
Code No. QPK-201, 201T
使用说明书

【 目 录 】

[1] 言	(2)
[2] 使用注意点	(2)
[3] 本产品的组成	(3)
[4] 必需品	(3)
[5] 说明书	(4)
1 . 使用 ABI PRISM®7700 的掺入法	(4)
2 . 使用 Roche LightCycler™ 的掺入法	(5)
3 . 添加逆转录酶的 one-step RT-PCR	(6)
[6] 常见问题	(8)
[7] 相关产品	(9)

【 注意 】

本产品为研究用试剂。请勿作为诊断、临床试剂用。
在使用本产品时，请严格遵守实验室的一般注意事项，安全操作。

“Purchase of this product is accompanied by a limited license to use it in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process for The Research Field in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, either by payment to Applied Biosystems or as purchased, i.e., an authorized thermal cycler.”

※LightCycler™是 Idaho Technology 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。

[1] 前言

1. 本产品概要

本产品已包括除引物和样品 DNA 以外的所有组成部分, 为 2×Master Mix。已含有 SYBR® Green I (Molecular Probes Inc.), 可用于未标记引物的掺入法 Realtime 定量 PCR。

2. 本产品特征

· 高适用性

- 1) 本产品中添加了 BSA, 能够应用于 Roche Diagnostic 公司的 LightCycler™ 以及其它使用 Glass Capillary 的分析体系。
- 2) 本产品中还添加了 Passive reference, 可应用于 Applied Biosystems 公司的 ABI PRISM®7700 等定量 PCR 仪。经确认, Passive reference 不会对 LightCycler™ 等产生影响。
- 3) 也可应用于 BioFlux 的 LineGene 定量 PCR 仪。

· 可进行高速热启动

为了抑制非特异性反应, 本产品加入了抗 Taq DNA 多聚酶的单克隆抗体进行热启动。此方法的特征是酶活力的释放极快, 变性条件下, **在 1 分钟内即可完成**; 各循环的变性步骤与普通 PCR 相同。

如果使用 LightCycler™ 等高速 PCR 仪, 则更能显示出其缩短时间的优越性。

[2] 使用注意点

1. 关于使用

- 本产品为研究用试剂。请勿作为诊断、临床试剂用。另外, 对于本产品的有害性调查还不十分完整。请适当使用保护用品, 安全操作。
- 一经融解后, 请缓慢颠倒, 充分混匀。

2. 关于保存

本产品原则上在 -20℃ 以下遮光冷冻保存。但是, 如果在短期内需持续使用时, 可于融解后在 4℃ 遮光保存, 此时最长可保存 3 周。保存时请使用遮光箱或产品内配有的铝袋 (QPK-201 中, 除包装以外, 另附一个铝袋, 可将融解后产品装入此袋, 4℃ 保存)。

建议每支产品融解后, 于 4℃ 状态保存并于 3 周内使用完毕。融解后的产品短期内不用时, 请装入原包装袋, 再次于 -20℃ 状态下进行遮光冷冻保存。

[3] 本产品的组成

[SYBR® Green Realtime PCR Master Mix]

已经包含除引物以外所有的 PCR 反应所需的试剂, 如 dNTPs、MgCl₂、Taq DNA 多聚酶、抗 Taq 单克隆抗体等, 并且已经包含了 SYBR® Green I, 本品为 2 倍浓度的溶液。

[4] 必需品

1. 必需的试剂、仪器

[引物]

请先准备用于检出和定量目标基因序列的引物对。如果需要重复进行定量试验时, 建议在对 PCR 循环条件和引物浓度进行摸索的基础上, 选择最适当的引物和反应条件。

※关于引物的设计

在引物设计过程中尽可能避免引物二聚体等现象的发生。掺入分析法中, 也会检测出引物二聚体等非特异性扩增产物, 在扩增曲线上无法区别, 因此, 引物的设计对灵敏度很重要。

目标片段的长度也很重要。一般来说, 目标片段越长越容易产生非特异性反应, 扩增效率也较低, 所以目标片段最好控制在 200bp 以下, 建议尽可能在 150bp 以下。

[蒸馏水]

请使用 PCR 用纯水。

[Realtime PCR 仪]

请使用 Applied Biosystems 公司的 ABI PRISM®7700、Roche Diagnostic 公司的 LightCycler™、BioFlux 公司的 LineGene 等的 Realtime PCR 仪。使用方法请根据相应仪器的说明书。

2. 样品 DNA

[cDNA]

- 1st strand cDNA 合成产物请使用苯酚处理·乙醇沉淀等方法提纯。1st strand cDNA 合成时的引物, 可采用随机引物或者 Oligo (dT) 引物, 请注意引物用量对于后续 PCR 反应的影响。
- 如果使用本公司的 1st strand cDNA 合成试剂盒 [ReverTra Ace-α[®]] (Code No: FSK-100), 请稀释 10 倍以上使用。原液也可以进行扩增, 但会对 cDNA 合成时的引物或逆转录酶对 PCR 的定量会产生影响, 因此, 建议稀释后使用。

[基因组 DNA 等]

请使用普通 PCR 使用的 DNA 纯化样品。如果是人类基因组 DNA, 1~10ng 比较适当。如果加入大量基因组 DNA, 会检测出自身的信号, 导致基线上飘。

[5] 操作说明

1. 使用 ABI PRISM®7700 的掺入法

(1) 反应液的配制

[PCR 反应液(例)]

(引物终浓度: 0.2 μM; 反应总体积: 50 μl)

蒸馏水	18 μ l
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	25 μ l
引物 1 (10 μ M)	1 μ l
引物 2 (10 μ M)	1 μ l
样品溶液	5 μ l
<hr/>	
Total	50 μ l

- 将 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 设定为总反应体积的 1/2，其它的组成成分请按照最适当条件改变。另外，如果要改变反应总体积时，请保持最适条件下各组分的比例。
- 引物浓度请在 0.2~0.6 μ M 的范围内进行调整。扩增效率不高时，可适当增加引物的用量，但是引物太多，可能会导致非特异性扩增的增加。

(2) PCR 的循环条件

- 下面是 PCR 实例。复性 / 延伸温度，请结合引物的 T_m 值在 55°C~65°C 左右进行调整。当然引物退火的最佳值可能超出此范围，此时请根据实际情况进行调整。
- 本产品可以在极短时间内释放多聚酶的活性，因此，最初的变性时间可以设定为 60 秒，循环中变性时间可以设定为 15 秒。
- 可将 Detector 设为「SYBR」、Quencher 设为「None」。详细的设定请参照定量 PCR 仪的说明书。
- 也可以进行 3 步法 PCR (例 2)。与 2 步法相比，发生非特异性的可能性要小一点，请根据实验结果进行调整。调整时，请参考引物的退火温度。退火温度较低的引物建议使用 3 步法。
- Realtime PCR 一般不进行长片段的扩增，所以不需要对延伸时间进行调整。如果要调整，也务必确保 data collection 步骤至少 30 秒以上。
- 详细的设定请参照定量 PCR 仪的说明书。

[PCR 循环(例 1)] (2 步法、复性 / 延伸温度 60°C)

```

95°C 60 秒
↓
95°C 15 秒          ×40 循环
60°C 60 秒(data collection) }
    
```

[PCR 循环(例 2)] (3 步法、结合 60°C / 延伸温度 72°C)

```

95°C 60 秒
↓
95°C 15 秒
60°C 15 秒          } ×40 循环
72°C 45 秒(data collection) }
    
```

2. 使用 Roche LightCycler™ 的掺入分析法

(1) 反应液的配制

[PCR 反应液(例)]

(引物终浓度: 0.2 μ M; 反应总体积: 20 μ l)

蒸馏水	7.2 μ l
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	10 μ l
引物 1 (10 μ M)	0.4 μ l
引物 2 (10 μ M)	0.4 μ l

样品溶液	2 μ l
Total	20 μ l

- 将 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 设定为总体积的 1/2, 其它的组分请参照最适条件改变。另外, 改变反应总体积时, 请保持最适当条件下各组分的比例。
- 引物浓度请在 0.2~0.6 μ M 的范围内进行调整。扩增效率不高时, 可适当增加引物的用量, 但是引物太多, 可能会导致非特异性扩增的增加。

(2) PCR 的实施

- 下面是 PCR 实例。复性 / 延伸温度, 请参照引物的 T_m 值在 55°C~65°C 左右进行调整。当然引物退火的最佳值可能超出此范围, 此时请根据实际情况进行调整。通常将退火时间设定为 0 秒 (一旦达到温度立即升温), 请根据实际情况进行设定。
- 本产品可以在极短时间释放多聚酶的活性, 因此, 最初变性时间可以设定为 30 秒, 各循环中的变性时间可以设定为 0 秒 (一旦达到变性温度马上降温)。但是, 对于 GC 含量高的目标片段, 有时将各循环的变性时间设定为 5 秒较好。
- 对于目标片段在 200bp 以内的反应, 通常将延伸时间设定为 15 秒, 可根据实际情况进行调整。但是请确保数据收集步骤在 10 秒以上。
- Detector 可用 F1, 另外, 通常 Temperature Transition Rate 全部设为 20°C/sec (最大)。详细的设定请参考相应定量 PCR 仪的说明书。
- 也可尝试采用 2 步法, 此时, 请在复性 · 延伸步骤进行数据收集。

[PCR 循环(例)] (3 步法 退火 55°C 15 秒 / 延伸 72°C)

95°C 30 秒

↓

95°C 0~5 秒

55°C 0~5 秒

72°C 15~30 秒 (data collection)

} ×40 循环

↓

熔解曲线 (Melting Curve) 分析

3. 添加逆转录酶的 one-step RT-PCR

(1) 概要

- 本试剂是以 cDNA、基因组 DNA 等 DNA 样品为模板的, 但在添加了逆转录酶以后, RNA 样品也可以进行 one step RT-PCR。但是**请注意: one step RT-PCR 比通常的 PCR 更容易发生非特异性反应**, 所以根据引物或反应条件的不同, 可能无法进行掺入法分析。
- 本说明书采用的是本公司的逆转录酶「ReverTra Ace®」(Code No: TRT-101, 102)。使用其他公司的逆转录酶时, 请适当调整反应条件。

(2) 反应液的配制

- 在普通的 PCR 反应液中添加「RNase Inhibitor」(Code No: SIN-101, 102) 0.5U/ μ l, ReverTra Ace® 0.01~0.1U/ μ l (终浓度)。其他组分无需改变。
- 建议将 ReverTra Ace® 进行稀释后使用。**具体稀释方法:** 将 RNase Inhibitor 用蒸馏水稀释至 5U/ μ l, 并以此作为稀释液来稀释 ReverTra Ace®。RT 稀释液请在临使用前配制, 弃去剩余的稀释液。
- 因为 RNA 模板中, 有时会混入基因组 DNA, 所以建议设置 RT(-) 对照。

逆转录酶的稀释:

[RT 稀释液(例)] (ReverTra Ace[®] 3U/ μ l (终浓度 0.3U/ μ l))

RT 稀释液 (RNase Inhibitor 5U/ μ l) 32 μ l

ReverTra Ace[®] (100U/ μ l) 1 μ l

Total 33 μ l

[PCR 反应液(例: 掺入分析法)]

蒸馏水 13 μ l

SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix 25 μ l

引物 1 (10 μ M) 1 μ l

引物 2 (10 μ M) 1 μ l

RT 稀释液 (ReverTra Ace[®] 3U/ μ L) 5 μ l

样品溶液 5 μ l

Total 50 μ l

- 将 Realtime PCR Master Mix 设定为总液量的 1/2, 其他的组成部分请参照最适当条件调整。另外, 如果要改变总体积, 请保持最适当条件下的各组分比例。LightCycler 的标准反应量为 20 μ l。
- 引物浓度请在 0.2~0.6 μ M 的范围内进行调整。扩增效率不高时, 可适当增加引物的用量, 但是引物过多, 可能会导致非特异性扩增的增加。

(3) PCR 的实施

• 在 PCR 循环 (参照操作说明 1 和 2) 之前先进行 42 $^{\circ}$ C 20 分左右的逆转录反应, 并将变性过程延长 5 分钟 (使逆转录酶完全失活, 避免影响 PCR)。然后, 参照操作说明 1 和 2 进行普通的循环。

• 下面是 PCR 实例。复性 / 延伸温度, 请结合引物的 T_m 值在 55 $^{\circ}$ C~65 $^{\circ}$ C 左右进行调整。当然引物退火的最佳值可能超出此范围, 此时请根据实际情况进行设定。

[ABI PRISM[®]7700(例 1)]

42 $^{\circ}$ C 20 分

↓

95 $^{\circ}$ C 5 分

↓

95 $^{\circ}$ C 15 秒 } $\times 40$ 循环

60 $^{\circ}$ C 60 秒 (data collection) }

[ABI PRISM[®]7700(例 2)]

42 $^{\circ}$ C 20 分

↓

95 $^{\circ}$ C 5 分

↓

95 $^{\circ}$ C 15 秒 } $\times 40$ 循环

60 $^{\circ}$ C 15 秒 }

72 $^{\circ}$ C 45 秒 (data collection) }

[Roche LightCycler[®](例)]

42 $^{\circ}$ C 20 分

↓

95 $^{\circ}$ C 5 分

↓
 95°C 0~5 秒
 55°C 0~5 秒
 72°C 15~30 秒(data collection) } ×40 循环

[6] 常见问题

1. 扩增曲线混乱

(1) PCR 仪设定方面的问题(参照相应仪器的说明书)

原 因	对 策
使用了不适合探针的 detector 设定	适当调整 detector 的设定, 再进行分析。
数据收集的设定不恰当	请调整设定再进行实验
样品位置设定错误	设定适当的样品位置后再进行分析或再进行实验。
其他仪器方面的故障	请根据各仪器的说明书进行点检。

(2) 试剂方面的问题

原 因	对 策
PCR 循环条件、引物的浓度、序列等不恰当	可以通过变更引物的浓度、退火温度来进行改善; 扩增不好时, 请尝试降低退火温度或提高引物浓度。提高退火温度或延长延伸时间偶尔也有效果。仍不能改善时, 建议重新设计引物。
样品纯度不好	通过苯酚抽提或乙醇沉淀等方法提纯后再进行实验。如样品为 cDNA, 逆转录酶的残留会有一定的影响。

2. 定量值重现性差

(1) 仪器设定方面的问题(参照相关仪器的说明书)

原 因	对 策
仪器方面的故障	因为仪器的不适用, 在温度管理或检测时产生重现性差。请根据相应仪器的说明书进行调整。

(2) 试剂方面的问题

原 因	对 策
样品纯度不好	不纯的样品会导致实验的重现性差。请使用混匀的样品。如样品为 cDNA, 逆转录酶的残留会有一定的影响。通过苯酚抽提和乙醇沉淀等方法提纯后再进行实验。
PCR 循环条件、引物、探针的浓度、序列等的不恰当	扩增效率差的 PCR 容易产生重现性差。通过变更引物的浓度或退火温度来进行调整。扩增不好时, 一般可降低退火温度或提高引物浓度, 也可以延长延伸时间。仍得不到改善时, 建议重新设计引物。

定量结果差	加大反应总体积，再进行实验。
-------	----------------

3. 空白样品中有信号

请在熔解曲线分析的基础上进行判断。

(1) 融解曲线顶点所对应的温度与阳性样品相同

原 因	对 策
阳性样品或 PCR 产物污染	首先请更换样品。如果还发生同样情况，请更换蒸馏水、引物或另启用一管新的 Master Mix 后再进行实验。

(2) 熔解曲线顶点所对应的温度比阳性样品低

原 因	对 策
发生了引物二聚体等的非特异性反应	请调整引物的浓度或温度。出现非特异性反应时，一般可提高结合温度或降低引物浓度。通过缩短退火·延伸的时间或进行 3 步法 PCR 的操作也可改善。仍得不到改善时，建议重新设计引物。

[7] 相关产品

品 名	包 装	Code No.	价 格
ReverTra Ace -α-	50 次份	FSK-100	\700
ReverTra Ace®	10,000U×1 本	TRT-101	\450
	50,000U×1 本	TRT-102	\1,800
RNase Inhibitor	2,500U×1 本	SIN-101	\200
	2,500U×5 本	SIN-102	\900
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	1ml×1 本	QPK-101T	\180
	1ml×5 本	QPK-101	\650