

Realtime PCR Master Mix(SYBR Green)

Code No. QPK-201, 201T

研究用

使用说明书

TOYOBO CO.,LTD.Biochemical Operations Department

OSAKA JAPAN

Distributor:Shanghai SOLOMON bio-sci&tech,Co.Ltd.

Tel:+86-21-33782046 Email:order@solomonbio.com

—— 目录 ——

[1] 前言	1
[2] 注意事项.....	1
[3] 产品内容.....	2
[4] 需备物品.....	2
[5] 操作步骤.....	3
[6] 常见问题.....	6
[7] 相关产品.....	7

“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 thermalcycler.”

※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。

本试剂盒内包含的试剂全部为研究用，请勿将其作为诊断及临床试剂使用。使用本试剂盒时，请严格遵守实验室内的常规注意事项及安全。

[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.)，可用于以未标记引物进行的掺入法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] 注意事项

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] 产品内容

[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] 需备试剂

1. 必需的试剂、仪器

[引物]

请事先准备用于检出・定量对象基因序列的引物对。如果需要重复进行定量试验时,建议在对PCR循环条件或引物浓度进行调整的基础上,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Assay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。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:FSK-100或FSQ),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。

[5] 操作步骤

1. 50ul反应体系分析方法：（以 **ABI PRISM®7700**为例）

(1)反应液的配制

[PCR反应液(例)]

(引物终浓度0.2μM、反应总体积 50μl)

蒸馏水	18 μl
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	25 μl
引物 1 (10 μM)	1 μl
引物 2 (10 μM)	1μl
样品溶液	5μl
Total	50μl

- 将SYBR® Green Realtime PCR Master Mix设定为总反应体积的1/2，其它的组成部分请按照最适当条件变更。另外，如果要变更反应总体积时，请保持最适条件下各组分的比例。
- 引物浓度请在0.2~0.6μM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℃~65℃左右进行调整。当然引物结合的最佳值可能超出此范围，此时请根据实际情况进行设定。
- 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，请根据发生状况进行尝试。此时，请结合引物调整退火温度。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℃)

95℃ 60秒
↓
95℃ 15秒
60℃ 60秒(data collection) } ×40循环

[PCR循环(例2)](3步法、结合 60℃ / 延伸温度 72℃)

95℃ 60秒
↓
95℃ 15秒
60℃ 15秒
72℃ 45秒(data collection) } ×40循环

2. 20ul反应体系分析方法：（以用Roche LightCycler™为例）

(1)反应液的配制

PCR反应液(例)](引物 0.2μM、总体积 20 μl)

蒸馏水	7.2μl
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	10 μl
引物 1 (10μM)	0.4μl
引物 2 (10μM)	0.4μl
样品溶液	2 μl
合計液量	20 μl

- 将SYBR® Green Realtime PCR Master Mix设定为总体积的1/2, 其它的组分请按照最适条件调整。另外, 改变反应总体积时, 请

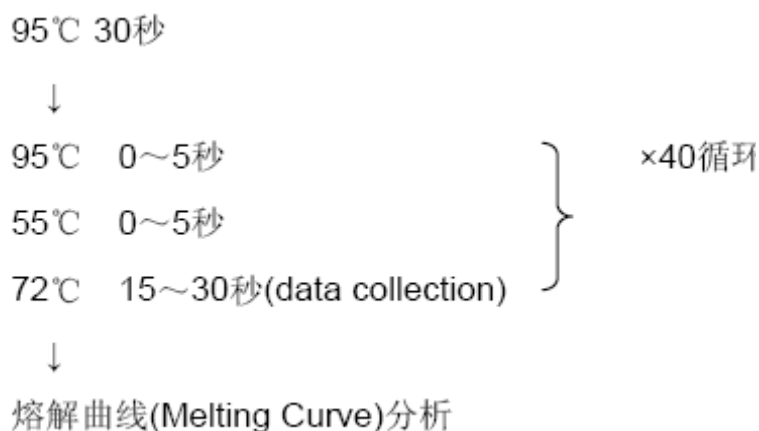
保持最适当条件下各组分的比例。

- 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，但引物太多，可能会导致非特异性增加。

(2) PCR的实施

- 下面是PCR实例。复性 / 延伸温度，请结合引物的T_m值在55℃~65℃左右进行调整。当然引物结合的最佳值可能超出此范围，此时请根据实际情况进行设定。通常将结合时间设定为0秒（一旦达到温度立即升温），请根据情况进行设定。
- 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。
- 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。但是请保证数据收集步骤在10秒以上。
- Detector可用F1，另外，通常Temperature Transition Rate全部设为20℃/sec(最大)。详细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℃ 15秒 / 延伸 72℃)



[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
detector设定不适合使用的探针	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

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。提高结合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点检。

(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。通过苯酚抽提或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较容易产生重现性差。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	提高反应总体积，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

NPK-200	总 RNA 抽提试剂盒-MagExtractor-RNA-	50T
STRI-101	总 RNA 抽提试剂-TRIzol Reagent	100ml
FSK-100	cDNA合成试剂盒-ReverTra Ace- α	50T
FSQ-101	cDNA合成试剂盒(QPCR用)-QPCR RT Kit	200T
TRT-101	逆转录酶的领袖-ReverTra Ace	10000U
SIN-101	RNA酶抑制剂-Rnase Inhibitor	2000U
FSK-201	Oligo(dT)引物-Oligo(dT)20	1nm
FSK-301	随机引物-Random Primer(9mer)	2.5nm
QPK-201	Realtime PCR Master Mix(SYBR Green)	200T
QPK-212	SYBR Green Realtime PCR Master Mix-PLUS	200T
QPK-101	Realtime PCR Master Mix(For Taqman)	200T
QRT-101	One Step qRT-PCR Master Mix(Taqman)	100T
QRT-201	One Step qRT-PCR Master Mix(SYBRGreen)	100T

[Manufacturer]

TOYOBO CO.,LTD.

Biochemical Operations Department

OSAKA JAPAN

[代理商]

上海硕盟生物科技有限公司

上海浦东新区高科西路 3000 弄 35 号

邮编: 201204

[联系方式]

Tel:+86-21-33782046 33782006

Email:order@solomonbio.com

Http: www.solomonbio.com