



One-step qPCR Kit
TM ®
RNA-direct SYBR Green
Realtime PCR Master Mix

Code No. QRT-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] 简介.....	1
[2] 制品内容.....	3
[3] 必需品.....	4
[4] 使用方法.....	6
[5] 相关实验.....	12
[6] 常见问题.....	15
[7] 相关产品.....	17

【 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] 简介

本品采用 *Thermus thermophilus* HB8 株来源的 rTth DNA 聚合酶,该酶在二价锰离子 (Mn^{2+}) 存在下具有很强的逆转录活性,利用该特性,开发出单酶一步法定量 PCR 试剂盒。逆转录反应和 PCR 反应在同一反应体系连续进行,仅需一次加样即可完成,减少了样品间交叉污染的危险,而且操作便捷,尤其适用于高通量实验。

本品中含有 SYBR Green I,可以方便地进行染料法定量 PCR。

特征

1. 逆转录反应和定量 PCR 反应在同一反应体系中进行

本品以 RNA 为模板,逆转录反应和 PCR 反应在同一反应体系连续进行,实验快速方便,非常适合于高通量实验。同时也减少了样品间交叉污染的风险。

2. 可应用于高级结构复杂的 RNA 和高 GC 含量的模板

本品采用单种耐热性 rTth DNA 多聚酶。和通常的逆转录酶相比较,可以在高温进行逆转录,非常有利于对具有复杂高级结构的 RNA 模板进行逆转录反应,同时该酶对高 GC 含量的模板也有出色的扩增表现,在定量 PCR 实验中也能高效扩增。

3. 快速热启动

本品采用抗体法热启动,对控制非特异性扩增非常有效。同时,抗体在高温下会迅速失活,释放多聚酶活性,最大限度地避免了高温对 RNA 模板和聚合酶活性的损伤。

4. 高适用性

可应用于 LineGene(BioFlux 公司),LightCycler(Roche 公司),ABI PRISM(ABI 公司)等仪器。

[2] 制品内容

本品含以下组分。

品名内容	保存	QRT-201 (50 μ l 反应 x 100 回用)	QRT-201T (50 μ l 反应 x 40 回用)
<i>RNA-direct</i> SYBR [®] Green Realtime PCR Master Mix	-20 (4 , 2 个月) 避光保存	500 μ l x 5	500 μ l x 2
50mM Mn(OAc) ₂	-20	500 μ l x 1	200 μ l x 1

RNA-direct SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix

Master Mix 是 2 \times 反应液，含反应 buffer、dNTPs、rTth DNA 多聚酶和多聚酶抗体，以及 passive reference 和 SYBR Green I。使用时，加入 RNA 模板、引物、Mn(OAc)₂ 溶液及 DEPC 水至 1 \times 即可。

Master Mix 请在-20 保存，融解后须上下颠倒混匀方可使用。使用后重新-20 保存，通常冻融 10 以内不会影响实验，但也请尽量避免反复冻融。如果一次使用量较少，可以在融解后分装成几管，每次取一管使用。如果短期内需多次使用，可在 4 保存，但须在 2 个月内用完。注意必须避光保存。

50mM Mn(OAc)₂

逆转录反应必需溶液。通常按反应体系的 1/20 体积（终浓度 2.5mM）添加，根据 RNA 模板的不同，也可适当增减 **Mn(OAc)₂** 的终浓度，以获得更高的扩增效率。

[3] 实验必需品

除本品外，还需以下仪器和试剂。

·定量 PCR 仪器

本品适用于 LineGene (BloFlux 公司), LightCycler (Roche 公司), **ABI PRISM (ABI 公司)** 等仪器。请根据各仪器的操作说明书进行实验。

·引物

请根据目的基因的序列设计引物，引物设计对定量PCR实验的精确性和重现性非常重要。

以下是设计引物的一般注意事项。

- 引物不必标记和修饰，长度20-30mer，GC含量在40-60%间。
- 扩增片段应小于200bp，过长的片段会降低扩增效率，而且容易导致非特异性反应，影响准确定量。
- 引物设计尽量横跨内含子，以防止基因组DNA的扩增而引起假阳性。

·RNase-free 水

建议使用超滤制备的 RNase-free 水，如果使用 DEPC 水，请通过高压灭菌去除 DEPC，否则残留的 DEPC 会影响反应。另外，用于定量 PCR 的水不要和其它实验混用，以避免污染影响定量。

·Total RNA

本品可直接以 Total RNA 作为模板进行定量。通过常规 AGPC (Acid Guanidium - Phenol - Chloroform) 法制备的 Total RNA 中可能会混入基因组 DNA，从而造成假阳性，必要时可用 DNase I 等试剂去除。在组织、细胞等样本中，作为目标检测对象的 mRNA 含量通常仅占 Total RNA 的 1-2%。

·poly(A)⁺ RNA (mRNA)

具有 poly(A)⁺ 结构的 mRNA 可通过 oligo(dT)制备。通过纯化过程，mRNA 得到高度浓缩，通常用于对 mRNA 的高灵敏度检测。需要注意的是，mRNA 比 Total RNA 更容易被 RNase 所降解，操作时需要特别小心。

[4] 使用方法

1. 使用 LineGene (BioFlux 公司)的 SYBR Green 分析法

(1)反应液的配制

[PCR 反应液(例)]

蒸馏水 (RNA-free)	Up to 10 μ l
RNA-direct SYBR [®] Green Realtime PCR Master Mix	5 μ l
50mM Mn(OAc) ₂	0.5 μ l
引物 1 (终浓度 0.2 μ M)	2pmol
引物 2 (终浓度 0.2 μ M)	2pmol
样品 RNA 溶液	<500ng
<hr/>	
Total	10 μ l

·蒸馏水必需用 RNase-free 水，建议用过滤法生成的 RNase-free 水。如用 DEPC 水，请通过高压灭菌彻底去除 DEPC。另外，避免与其它实验混用 RNase-free 水。

·因为添加量在 2-6pmol (0.2-0.6 μ M) 间调整，扩增不好时，可适当加大引物量，但引物量过多，可能会造成非特异性扩增。

·Mn(OAc)₂ 终浓度通常为 2.5mM，根据 RNA 模板浓度和序列的不同，有时适当增减 Mn(OAc)₂ 浓度会得到更好的结果。

·作为的模板的 RNA，通常 Total RNA 不要超过 500ng，poly(A)⁺ RNA (mRNA) 不要超过 100ng，模板过多会降低反应效率，从而造成扩增曲线的线性不好。

(2)PCR 的实施

[RT-PCR 温度设定(例)]

变性 1	90	30s
↓		
RT	61	20min
↓		
变性 2	95	30s
↓		
PCR 循环	95	15s
(45Cycles)	55	15s
	74	30s (data collection)

↓

熔解曲线分析

垂询电话：021-58794900

[Http://www.bio-toyobo.cn](http://www.bio-toyobo.cn)

- 本品是高速热启动产品（参见第 2 页），第一次变性过程 90℃，30s（变性 1）后，即可充分释放酶活，过分加热会影响酶活性及损伤模板 RNA 的稳定性。
- 退火温度根据引物的 Tm 值在 55℃-65℃ 间进行调整，有时最佳温度可能超出此范围，请根据实际情况调整。
- 定量 PCR 中目标片段通常都很小，对延伸时间不需调整。
- 荧光 detection channel 请选择 Channel F1。
- 除以上举例的三步法外，也可用 2 步法进行定量 PCR，此时请将 data collection 设置在退火/延伸步骤。

2. Applied Biosystems 7900HT（ABI 公司）的 SYBR[®] Green 分析法

(1) 反应液的配制

[PCR 反应液(例)]

蒸馏水（RNA-free）	Up to 50 μ l
RNA-direct SYBR [®] Green Realtime PCR Master Mix	25 μ l
50mM Mn(OAc) ₂	2.5 μ l
引物 1 (终浓度 0.2 μ M)	10pmol
引物 2 (终浓度 0.2 μ M)	10pmol
样品 RNA 溶液	<2.5 μ g
<hr/>	
Total	50 μ l

- 蒸馏水必需用 RNase-free 水，建议用过滤法生成的 RNase-free 水。如用 DEPC 水，请通过高压灭菌彻底去除 DEPC。另外，避免与其它实验混用 RNase-free 水。
- 因为添加量在 10-30pmol（0.2-0.6 μ M）间调整，扩增不好时，可适当加大引物量，但引物量过多，可能会造成非特异性扩增。
- Mn(OAc)₂ 终浓度通常为 2.5mM，根据 RNA 模板浓度和序列的不同，有时适当增减 Mn(OAc)₂ 浓度会得到更好的结果。
- 作为模板的 RNA，通常 Total RNA 不要超过 2.5 μ g，poly(A)⁺ RNA（mRNA）不要超过 500ng，模板过多会降低反应效率，从而造成扩增曲线的线性不好。

(2)PCR 的实施

[RT-PCR 温度设定(例)]

变性 1	90	30s
↓		
RT	61	20min
↓		
变性 2	95	60s
↓		
PCR 循环	95	15s
(45Cycles)	55	15s
	74	45s (data collection)
↓		

熔解曲线分析

- 本品是高速热启动产品 (参见第 2 页), 第一次变性过程 90 , 30s (变性 1) 后, 即可充分释放酶活, 过分加热会影响酶活性及损伤模板 RNA 的稳定性。
- 退火温度根据引物的 Tm 值在 55 -65 间进行调整, 有时最佳温度可能超出此范围, 请根据实际情况调整。
- Detector 通常设为 SYBR Green , Quencher : None , Passive Reference 设为 ROX。请根据仪器说明进行相应设置。
- 定量 PCR 中目标片段通常都很小, 通常不需调整延伸时间, 如需变更, 请确保 data collection 步骤在 30s 以上。
- 除以上举例的三步法外, 也可用 2 步法进行定量 PCR, 此时请将 data collection 设置在退火/延伸步骤。
- 上例采用 Applied Biosystems 7900HT 的标准模式。使用 SYBR Green 分析法时, ABI 公司不推荐使用快速模式 (Fast Mode)。

3. 使用 LightCycler™ (Roche 公司)的 SYBR® Green 分析法

(1)反应液的配制

[PCR 反应液(例)]

蒸馏水 (RNA-free)	Up to 20 μ l
RNA-direct SYBR [®] Green Realtime PCR Master Mix	10 μ l
50mM Mn(OAc) ₂	1 μ l
引物 1 (终浓度 0.2 μ M)	4pmol
引物 2 (终浓度 0.2 μ M)	4pmol
样品 RNA 溶液	<1 μ g
<hr/>	
Total	20 μ l

·蒸馏水必需用 RNase-free 水，建议用过滤法生成的 RNase-free 水。如用 DEPC 水，请通过高压灭菌彻底去除 DEPC。另外，避免与其它实验混用 RNase-free 水。

·因为添加量在 4-12pmol (0.2-0.6 μ M) 间调整，扩增不好时，可适当加大引物量，但引物量过多，可能会造成非特异性扩增。

·Mn(OAc)₂ 终浓度通常为 2.5mM，根据 RNA 模板浓度和序列的不同，有时适当增减 Mn(OAc)₂ 浓度会得到更好的结果。

·作为的模板的 RNA，通常 Total RNA 不要超过 1 μ g，poly(A)⁺ RNA (mRNA) 不要超过 200ng，模板过多会降低反应效率，从而造成扩增曲线的线性不好。

(2)PCR 的实施

[RT-PCR 温度设定(例)]

变性 1	90	30s
↓		
RT	61	20min
↓		
变性 2	95	30s
↓		
PCR 循环	95	5s
(45Cycles)	55	10s
	74	15s (data collection)

↓
熔解曲线分析

·本品是高速热启动产品 (参见第 2 页)，第一次变性过程 90 ， 30s (变性 1) 后，即可充分释放酶活，过分加

热会影响酶活性及损伤模板 RNA 的稳定性。

·退火温度根据引物的 Tm 值在 55 -65 间进行调整，有时最佳温度可能超出此范围，请根据实际情况调整。

·对于 200bp 以内的目标片段，延伸 15s 通常已经足够。如需调整，请确保 data collection 步骤在 10s 以上。

·Detector 设为 F1。

·除以上举例的三步法外，也可用 2 步法进行定量 PCR，此时请将 data collection 设置在退火/延伸步骤。

·本品支持 20 /sec 的快速升温模式，扩增效果不佳时，可试着在退火和延伸步骤将升温速度降至 2 /sec。

[5] 相关实验

1. Total RNA 的 DNase I 处理

用 AGPC(Acid Guanidium-Phenol-Chloroform)法等常规方法制备的 Total RNA 中经常会混入基因组 DNA，必要时可通过 DNase I 处理，方法如下：

(1)反应液配制：

反应液组成（例）

蒸馏水（RNA-free）	Up to 10 μ l
Total RNA	X μ g
10 \times DNase I Buffer	1 μ l
RNase-free DNase I（10U/ μ l）	0.5 μ l
<hr/>	
Total	10 μ l

(2)反应和纯化

上述反应液置冰浴反应 10-30min。

↓
加入 100 μ l 蒸馏水，100 μ l TE 饱和酚，混匀后，冰浴 5min。

↓
12,000rpm、离心 5min，取上清。

↓
加入 100 μ l 氯仿，混匀。

↓
12,000rpm、离心 5min，取上清。

↓
加入 5 μ l 20mg/ml 肝糖（共沉剂），100 μ l 5M 醋酸胺，200 μ l 异丙醇，混合均匀，-20 放置 30min。

↓
12,000rpm、离心 5min，弃上清。

↓

在沉淀中加入 70%乙醇洗涤。

↓

12,000rpm、离心 5min，弃上清。

↓

用适量蒸馏水溶解沉淀。

2. poly(A)⁺ RNA 纯化法

目的基因含量很低时，将 Total RNA 纯化成 poly(A)⁺RNA，可提高灵敏度。以下以 MagExtractor -mRNA-（code No. NPK-801，在磁硅珠上结合有 oligo(dT)，专用于 mRNA 的纯化）为例介绍 poly(A)⁺RNA 的纯化。

(1)纯化前 DNase I 反应液配制：

反应液组成（例）

MagExtractor -mRNA- 溶出液	Up to 100 μ l
Total RNA (~ 100ug)	X μ g
10 \times DNase I Buffer	10ul
RNase-free DNase I (10U/ul)	1ul
<hr/>	
Total	100 μ l

上述反应液冰浴反应 15min。

↓

加入 400ul 溶解液（含 2-ME）和 800ul 吸附液。

(2)纯化

在新的 1.5ml 离心管中加入 250ul 磁硅珠。

↓

使用磁性台架（Magical Trapper (Code No. MGS-101)）进行固液分离（B/F 分离），弃上清。

↓

在磁珠中加入上述处理后的 Total RNA 溶液。

↓

充分混匀。

↓

室温放置 10min。

↓

固液分离（B/F 分离）弃上清。

↓

加入 1ml 洗净液。

↓

充分混匀。

↓

固液分离（B/F 分离）弃上清。

↓

加入 1ml 洗净液。
↓
充分混匀。
↓
固液分离 (B/F 分离) 弃上清。
↓
加入 1ml 洗净液。
↓
充分混匀。
↓
固液分离 (B/F 分离) 弃上清。
↓
Spin down, 再次去除上清。
↓
加入适量溶出液
↓
充分混匀。
↓
65 °C 温浴 2min。
↓
充分混匀。
↓
Spin down。
↓
固液分离 (B/F 分离) 回收上清。

·在 MagExtractor -mRNA- 试剂盒的标准操作中,上述纯化过程须重复 2 次,虽然一次纯化也能满足通常的实验需要,但是对 poly(A)⁺RNA 的纯度要求很高时,建议重复 2 次,以彻底除去可能残留的基因组 DNA 和 rRNA。

·关于纯化操作,详细说明请参考 MagExtractor -mRNA- 试剂盒的说明书。

[6] 常见问题

1 . 扩增曲线混乱或没有

(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 设成不适合 SYBR Green I 检测	适当调整仪器的设定，再进行分析。
数据收集的设定不恰当	通常设在延伸步骤，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。
仪器方面的其他故障	请根据各仪器的说明书进行点检。
PCR 条件、引物序列或浓度不当	请确认引物浓度及 PCR 条件，扩增不好时，通常先尝试降低退火温度，延长退火时间和提高引物浓度，有时也可以提高退火温度，增加延伸时间，降低升温速度。对于 GC 含量高的模板，可以适当延长变性时间。如果还是扩增不好，请重新设计引物。
RNA 质量问题	RNA 模板可能被降解，重新抽提 RNA。

2. 定量值重现性差

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。
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。另外，样品中残留的基因组 DNA 也可能导致定量值偏差，请用 DNase 处理以除去基因组 DNA。
PCR 反应条件、引物浓度、序列等不恰当	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 PCR 反应条件来进行调整。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。如模板的 GC 含量较高，可延长变性时间。仍得不到改善时，建议重新设计引物。
计量误差	反应体积太小会导致检测精度下降。请根据定量 PCR 仪推荐的反应体积重新实验。

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。)

原因	对策
阳性样品或 PCR 产物污染	首先请更换用作空白样本的水。如果还发生同样情况，请分别检查蒸馏水、引物或另启用一管新的 Master Mix 后再进行实验。
发生了引物二聚体等的非特异性反应	请调整引物浓度和 PCR 条件。出现非特异性扩增时，请提高退火温度、延长退火时间、缩短延伸时间或降低引物浓度。尝试改用三步法 PCR。如果还是有非特异性扩增，请重新设计引物。

[7] 相关产品

高特异性一步法定量 PCR 试剂 (Taqman 探针法)

品名	内容	Code No.
RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix (探针法)	500µl x2 500µl x5	QRT-101T QRT-101

RNA 制备相关试剂

品名	内容	Code No.
MagExtractor™ -mRNA-	5 回用	NPK-801
MagExtractor™ -RNA-	50 回用	NPK-200
Magical Trapper	1 个	MGS-101

Realtime PCR 相关试剂

品名	内容	Code No.
Realtime PCR Master Mix (探针法)	1ml x1	QPK-101T
	1ml x5	QPK-101
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (染料法)	1ml x1	QPK-201T
	1ml x5	QPK-201
ReverTra Ace -α-®	50 回用	FSK-100
ReverTra Ace®	10,000U x1	TRT-101
RNase Inhibitor	2,000U x1	SIN-101
	2,000U x5	SIN-101B

[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