



10-08

# SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix

(Code No.QPK-201,QPK-201T)

使用说明书

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department  
OSAKA JAPAN

# 目 录

|                  |    |
|------------------|----|
| [1] 前言 .....     | 1  |
| [2] 本产品的组成 ..... | 2  |
| [3] 其他必需品 .....  | 3  |
| [4] 使用方法 .....   | 4  |
| [5] 常见问题 .....   | 8  |
| [6] 相关产品 .....   | 10 |

## 【 注意 】

本产品为科研用试剂。**请勿作为诊断、临床试剂使用**。此外，对于本产品的有害性调查还不十分全面，因此，在使用时，请严格遵守实验室的一般注意事项，适当使用保护用品，安全操作。

本产品是在与F. Hoffmann-La Roche Ltd.、Roche Molecular Systems Inc.及The Perkin-Elmer Corporation的特许合同约定下销售的。

“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 Perkin-Elmer or as purchased, i.e., an authorized thermal cycler.”

※LightCycler™是Idaho Technology Inc.和Roche Molecular Systems Inc.的商标。

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

※SYBR®是Molecular Probes Inc.的注册商标。

※ABI PRISM®是The Perkin-Elmer Corporation的注册商标。

## [1] 前言

本产品是在 Taq DNA polymerase 基础上开发的通用性很高的 Realtime PCR 用 2×浓度的预混液，已包含除引物和样品 DNA 以外的所有组分。适用于以 cDNA、DNA 为样品的 SYBR® Green I 掺入法检测，可获得重复性良好的结果。

### ◆本产品特征◆

#### 1. 高通用性

本产品适用于各种常见实时定量 PCR 仪：

1) 产品中添加了 BSA，能够应用于 Roche 公司的 LightCycler™ 以及其它使用 Glass Capillary 的分析体系；

2) 产品中还添加了 Passive Reference (内含 1×浓度 ROX reference dye)，可应用于 Applied Biosystems 公司的 ABI PRISM® 实时定量 PCR 仪。经确认，使用其它仪器的时候，即使不使用 Passive Reference，也不会对实验本身造成影响。

本说明书仅以 Applied Biosystems 公司的 ABI PRISM® 和 Roche 公司的 LightCycler™ 为例进行说明，供使用者参考。对于其他厂家的实时定量 PCR 仪，请使用者根据仪器说明书，并结合实际情况进行适当调整。

#### 2. 快速热启动

为了抑制非特异性反应，本产品中添加了抗 Taq DNA 多聚酶的单克隆抗体进行热启动。此方法的优点是酶活力的释放极快，在 1 分钟内即可完成预变性。各循环的变性步骤只需考虑核酸变性所需的时间进行设定即可。

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。

#### 3. 操作简便

由于采用了 2× Master Mix 体系，已经把除引物、模板之外的酶、Buffer、dNTP 等预混在一起，因而减少了操作步骤，既缩短了加样时间，又降低了污染的几率。

### <关于 SYBR® Green I 检测体系>

SYBR® Green I 检测体系通过 SYBR® Green I 染料与 DNA 的扩增产物结合，并且结合后染料的荧光强度的增强作为指标，进行检测。

虽然该方法和普通的 PCR 反应一样简便，但由于会出现引物二聚体、目的条带以外的扩增产物等，因此有必要在扩增后对融解曲线进行分析确认。

## [2] 本产品的组成

本产品分为两个包装，50  $\mu$ l 反应体系可用 40 次份（QPK-201T）和 200 次份（QPK-201）。

### <QPK-201T>

SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix 1 ml

### <QPK-201>

SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix 1 ml x 5

该组分是包含反应缓冲液、SYBR<sup>®</sup> Green I、dNTPs、Mg<sup>2+</sup>、Taq DNA聚合酶及抗Taq单克隆抗体的2×预混液。请添加模板DNA和引物，并用灭菌蒸馏水配制成为1×浓度后再使用。该溶液中**已包含1×浓度ROX（Passive reference dye）**。

## <注意>

本产品原则上在-20℃以下避光冷冻保存。但是，如果在短期内需持续使用时，可于融解后在4℃避光保存，此时最长可保存2个月。保存时请使用避光箱或产品内配有的铝箔袋。

5支装的QPK-201包装内另外还添附有一个铝箔袋，建议逐支融解使用。融解后，于4℃状态保存，**并尽量在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℃状态下进行避光冷冻保存。（本公司经实验确认，反复冻融20次对产品质量没有明显影响。）

**为保证实验效果，请在收到产品的一年之内使用完毕。**

### [3] 其他必需品

除本产品外，还需准备以下试剂和仪器。

#### (1) Realtime PCR 仪

本产品适用于普通及高速的模块型 (Block Type)、玻璃毛细管型 (Glass Capillary Type) 等各种 Realtime PCR 仪。请使用者根据各仪器说明书，结合实际情况进行适当调整。本书仅以 Applied Biosystems 公司的 ABI PRISM<sup>®</sup>和 Roche 公司的 LightCycler<sup>™</sup>为例进行说明，供使用者参考。

#### (2) 引物

请根据目的基因的序列设计引物对，引物设计对实时定量PCR实验的精确度和重现性非常重要。以下列举了设计引物时需注意的一般事项。

- 引物长度请设定为 **20 ~ 30mer**、GC 含量为 **40 ~ 60%**。
- 扩增片段应小于 **200bp**，如可能请尽量设定在 **50 ~ 150bp**。过长的片段容易导致扩增效率低下，而且容易导致非特异性反应，影响定量准确性。
- 引物设计应尽量**横跨内含子**，以防止基因组 DNA 的扩增而引起假阳性。

#### (3) 模板 DNA

##### cDNA

1st Strand cDNA合成产物请使用苯酚氯仿处理•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)<sub>n</sub>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 -  $\alpha$  -」(Code: FSK-100)，请稀释**10倍以上**使用。原液也可以进行扩增，但cDNA合成时的引物或逆转录酶会对PCR产生影响，因此，建议稀释后使用。添加量不应超过总反应体系的10%。过量的添加会大大改变PCR反应缓冲液的组成，导致定量性低下。

※本公司的 Realtime PCR 用逆转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Kit (Code No.FSQ-101)，通过改良组分，使带入到 Realtime PCR 反应体系的逆转录反应液的影响降到最小，即使在 PCR 反应体系中添加最多至 **20%**的液量，也能表现出良好的反应曲线。

**基因组 DNA**

请使用普通PCR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，会检测出基因组本身的信号，导致基线上飘。

**(4) 蒸馏水**

请使用普通PCR用灭菌蒸馏水。

**[4] 使用方法****4.1 ABI PRISM®7700 的 SYBR® Green 掺入法使用说明****(1) 反应液的配制**

| 试剂                                  | 添加量        | 终浓度         |
|-------------------------------------|------------|-------------|
| 蒸馏水                                 | 16 $\mu$ l |             |
| SYBR® Green Realtime PCR Master Mix | 25 $\mu$ l | 1x          |
| 上游引物 (10 $\mu$ M)                   | 2 $\mu$ l  | 0.4 $\mu$ M |
| 下游引物 (10 $\mu$ M)                   | 2 $\mu$ l  | 0.4 $\mu$ M |
| 样品溶液                                | 5 $\mu$ l  |             |
| Total volume                        | 50 $\mu$ l |             |

- 将SYBR® Green Realtime PCR Master Mix设定为反应体系的1/2，其他的组成成份请参照最适条件进行调整。如需改变反应体系的总体积，其他组成成份也应按相同比例改变。
- 引物的添加量请在终浓度0.2~0.6  $\mu$ M的范围内进行调整。若扩增效果不理想，增加引物的添加量会有所改善，但添加量过多，则可能会由于非特异性扩增的原因，出现信号检出率低的情况。
- 实际配制时，可先将除样品溶液之外的其他组份预混成 $n + \alpha$ 倍（ $n$ 为样品数， $\alpha$ 为分注损耗）的混合液，然后分注到各管（即 $n$ 管），最后在每管中分别加入相应的样品溶液。

**(2) PCR的循环条件**

[PCR循环(例1)](三步法, 退火温度 60°C / 延伸温度 72°C)

95°C 60s

↓

|                |                       |
|----------------|-----------------------|
| PCR循环 (×40循环): |                       |
| 95°C           | 15s                   |
| 60°C           | 15s                   |
| 72°C           | 45s (data collection) |

↓

融解曲线分析(Melting Curve Analysis)

[PCR循环(例2)](两步法, 退火 / 延伸温度 60°C)

95°C 60s

↓

|                |                       |
|----------------|-----------------------|
| PCR循环 (×40循环): |                       |
| 95°C           | 15s                   |
| 60°C           | 60s (data collection) |

↓

融解曲线分析(Melting Curve Analysis)

- 首先请尝试三步法（例1）。退火温度请根据引物的 $T_m$ 值在55°C–65°C之间进行调整。根据引物的不同，有时最佳温度可能超出此范围，此时请根据实际情况调整。
- 本产品因可以在极短时间内完成多聚酶的再活性化，所以最初变性时间60秒，各循环变性时间15秒即可达到良好的扩增效果。请注意，绝大多数情况下，最初变性时间1分钟就足够了，过分加热会影响酶的活性，特别要注意避免变性时间超过5分钟。
- 请将Detector设为SYBR，Quencher设为None。详细设置请参照仪器说明书。
- 实时定量PCR中目标片段通常都很小，一般不需调整延伸时间，如需变更，请务必确保data collection步骤在30秒以上。
- 上述实例的循环设置采用的是三步法。此外也可采用两步法作为PCR的循环条件，此时请将data collection设置在退火 / 延伸步骤（即将退火 / 延伸步骤合并在一起）。
- 融解曲线分析请根据各仪器的标准设定。详细请见各仪器的使用说明书。

## 4.2 Roche Light Cycler™ 的 SYBR® Green 掺入法使用说明

### (1) 反应液的配制

| 试剂                                  | 添加量         | 终浓度         |
|-------------------------------------|-------------|-------------|
| 蒸馏水                                 | 6.4 $\mu$ l |             |
| SYBR® Green Realtime PCR Master Mix | 10 $\mu$ l  | 1x          |
| 上游引物 (10 $\mu$ M)                   | 0.8 $\mu$ l | 0.4 $\mu$ M |
| 下游引物 (10 $\mu$ M)                   | 0.8 $\mu$ l | 0.4 $\mu$ M |
| 样品溶液                                | 2 $\mu$ l   |             |
| Total volume                        | 20 $\mu$ l  |             |

- 将SYBR® Green Realtime PCR Master Mix设定为反应体系的1/2，其他的组成成份请参照最适条件进行调整。如需改变反应体系的总体积，其他组成成份也应按相同比例改变。
- 引物的添加量请在终浓度0.2~0.6  $\mu$ M的范围内进行调整。若扩增效果不理想，增加引物的添加量会有所改善，但添加量过多，则可能会由于非特异性扩增的原因，出现信号检出率低的情况。
- 实际配制时，可先将除样品溶液之外的其他组份预混成 $n+\alpha$ 倍（ $n$ 为样品数， $\alpha$ 为分注损耗）的混合液，然后分注到各管（即 $n$ 管），最后在每管中分别加入相应的样品溶液。

### (2) PCR的循环条件

[PCR循环(例)](三步法 退火温度 55°C / 延伸温度 72°C)

95°C 30s

↓

|                |                       |
|----------------|-----------------------|
| PCR循环 (×40循环): |                       |
| 95°C           | 5s                    |
| 55°C           | 10s                   |
| 72°C           | 15s (data collection) |

↓

融解曲线分析(Melting Curve Analysis)

- 退火温度请根据引物的T<sub>m</sub>值在55°C–65°C之间进行调整。根据引物的不同，有时最佳温度可能超出此范围，此时请根据实际情况调整。首先，请尝试退火温度55°C、退火时间10秒。若扩增效果不理想，可将退火时间延长至20秒；若出现引物二聚体等非特异性反应，可将退火时间缩短至5秒。
- 本产品因可以在极短时间内完成多聚酶的再活性化，所以最初变性时间30秒，各循环变性时间5秒即可达到良好的扩增效果。请注意，绝大多数情况下，最初变性时间1分钟就足够了，过分加热会影响酶的活性，特别要注意避免变性时间超过5分钟。
- 对于200bp以内的目标片段，延伸15秒通常已经足够。如需调整，请确保data collection步骤在10秒以上（仪器数据采集方式限定）。
- Detector设为F1。另外，通常可将Temperature Transition Rate全部设为20°C/sec(最大)。详细设置请参照仪器使用说明书。
- 上述实例的循环设置采用的是三步法。如果发生了非特异性反应也可尝试采用两步法，此时请将data collection设置在退火 / 延伸步骤（即将退火 / 延伸步骤合并在一起）。
- 融解曲线分析请根据各仪器的标准设定。详细请见各仪器的使用说明书。

## [5] 常见问题

### ➤ 扩增曲线混乱或没有

仪器设置方面的问题（请参照相关仪器的说明书）

| 原因                  | 对策                                   |
|---------------------|--------------------------------------|
| Detector的设置与荧光染料不匹配 | 根据荧光染料的种类不同，对检测仪器的设置进行相应的更改，然后再进行实验。 |
| 数据采集的设置不恰当          | 请调整设置再进行实验。                          |
| 样品位置设置错误            | 设置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或不匹配       | 请根据各仪器的说明书进行检查。                      |

试剂方面的问题

| 原因                   | 对策   |
|----------------------|--|
| PCR反应条件、引物的浓度、序列等不恰当 | 可通过调整引物浓度、PCR反应条件等加以改善。扩增不理想时，一般可尝试降低退火温度、延长退火时间或提高引物浓度。在少数情况下，提高退火温度或延长延伸时间也会有改善。另外，对于GC含量高的目的片段，延长变性时间也会有改善。仍不能改善时，建议重新设计引物。 |
| 样品纯度不好               | DNA样品可通过苯酚抽提、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。  |

### ➤ 定量值重现性差

仪器设置方面的问题（请参照相关仪器的说明书）

| 原因          | 对策  |
|-------------|---|
| 仪器方面的故障或不匹配 | 因为仪器的不适用，在温度管理或检测时会产生扩增曲线散乱的情况。此时请根据相应仪器的说明书进行检查。 |

## 试剂方面的问题

| 原因                    | 对策   |
|-----------------------|--|
| 样品纯度不好                | 不纯的样品会导致扩增曲线散乱，请使用充分混匀的样品。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反应条件、引物的浓度、序列等的不恰当 | 扩增效率差的PCR容易产生扩增曲线散乱的情况。此时，可通过调整引物的浓度、PCR其他反应条件等来改善扩增效果。一般可尝试降低退火温度、延长退火时间或提高引物浓度。有时延长延伸时间也会有改善。对于GC含量高的目的片段，延长变性时间也会有改善。扩增曲线散乱较严重时，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。  |

### ➤ 空白样品中有信号

请在融解曲线分析(Melting Curve Analysis)的基础上进行判断。

融解曲线的顶点所对应的温度与阳性样品的温度相同

| 原因             | 对策   |
|----------------|--|
| 阳性样品或PCR产物等的污染 | 首先请更换用作空白样本的水。如果还发生同样情况，请分别更换蒸馏水、引物或另启用一管新的Master Mix后再进行实验。 |

融解曲线的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 | 调整引物的浓度或PCR其他反应条件。出现非特异性反应时，一般可尝试提高退火温度、缩短退火·延伸时间，或降低引物浓度。进行三步法PCR的操作也可能改善。仍得不到改善时，建议重新设计引物。 |

## [6] 相关产品

## SYBR® Green I 检测体系用 Realtime PCR 试剂

| 品名   | 容量                 | Code No. |
|--|--------------------|----------|
| THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix                 | 1ml x 1 (40次份)     | QPS-201T |
|  | 1.67ml x 3 (200次份) | QPS-201  |
| SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus- | 1ml x 5 (200次份)    | QPK-212  |

※ THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix 中，50X ROX reference dye 另外单独添付。

※ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus- 中，Plus solution 另外单独添付。

※ 容量是指反应体系为 50  $\mu$ l 时的反应次数。

## TaqMan® 探针法检测体系用 Realtime PCR 试剂

| 品名                         | 容量                 | Code No. |
|----------------------------|--------------------|----------|
| THUNDERBIRD Probe qPCR Mix | 1ml x 1 (40次份)     | QPS-101T |
|                            | 1.67ml x 3 (200次份) | QPS-101  |
| Realtime PCR Master Mix    | 1ml x 5 (200次份)    | QPK-101  |

※ THUNDERBIRD Probe qPCR Mix 中，50X ROX reference dye 另外单独添付。

※ 容量是指反应体系为 50  $\mu$ l 时的反应次数。

## Realtime PCR用cDNA合成试剂盒

| 品名                       | 容量    | Code No. |
|--------------------------|-------|----------|
| ReverTra Ace qPCR RT Kit | 200次份 | FSQ-101  |

## 1 步法•Realtime PCR 相关试剂

| 品名  | 容量                   | Code No. |
|---|----------------------|----------|
| 各种荧光Probe、荧光引物检测体系用<br>1步法•Realtime PCR试剂<br><b>RNA-direct Realtime PCR Master Mix</b>                | 0.5ml x 5<br>(100次份) | QRT-101  |
| SYBR® Green I检测体系用<br>1步法•Realtime PCR试剂<br><b>RNA-direct SYBR® Green<br/>Realtime PCR Master Mix</b> | 0.5ml x 5<br>(100次份) | QRT-201  |

※ RNA-direct 系列中，50mM Mn(OAc)<sub>2</sub> 另外单独添付。

※ 容量是指反应体系为 50  $\mu$ l 时的反应次数。

[销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

地址：上海市浦东新区张杨路 500 号华润时代广场 28 楼 AL

邮编：200122

订购 • 技术相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

[生产商]

东洋纺株式会社敦贺生物工厂

地址：日本国福井县敦贺市东洋町 10 番 24 号

代理商资料：