



10-10

Realtime PCR Master Mix

(Code No.QPK-101,QPK-101T)

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	7
[6] 相关产品	9

【 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、探针及样品DNA以外的所有组分。经添加不同的探针和引物后，可用于TaqMan[®]检测、Hybridization Probe检测的Realtime PCR。当然也可以用于普通PCR。

◆ 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，以往需要 10 分钟以上的预变性在 1 分钟内即可完成，各循环的变性步骤只需考虑核酸的变性时间进行设定即可。

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。

<关于荧光Probe检测体系>

以TaqMan[®] Probe为代表的荧光Probe检测体系，是一种使用只有在与目的扩增产物特异性混合 (hybridize) 时才会发荧光 (或者消荧光) 的特殊Probe的检测体系，与SYBR[®] Green I检测体系相比，可进行特异性更高的检测。

虽然无法检测出非特异性扩增产物，但反应特异性较低的情况下，目的片段

[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。

(2) 引物及探针

请根据目的基因的序列设计引物对，引物、探针的设计对实时定量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。

请准备适用于目的基因序列的荧光Probe。Probe序列的设计请参考各Probe的设计指导。

(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)_n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)，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对PCR会产生影响，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TaqMan®探针法使用说明

(1) 反应液的配制

试剂	添加量	终浓度
蒸馏水	14 μ l	
Realtime PCR Master Mix	25 μ l	1x
上游引物 (10 μ M)	2 μ l	0.4 μ M
下游引物 (10 μ M)	2 μ l	0.4 μ M
TaqMan®探针 (5 μ M)	2 μ l	0.2 μ M
样品溶液	5 μ l	
Total volume	50 μ l	

- 将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0.2~1 μ M的范围内进行调整。探针的添加量请在终浓度0.05~0.3 μ 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。
- 如使用的是市售的引物•探针套装, 具体添加量请参照其推荐条件。SNPs

Typing的试剂也可以使用。

- 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， α 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)](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)

- 退火 / 延伸温度，请结合引物和探针的具体情况进行调整。如使用的是市售的引物·探针套装，具体添加量请参照其推荐条件。
- 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。
- 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。
- 详细设置请参照仪器使用说明书。

4.2 Roche Light Cycler™的Hybridization Probe法使用说明

(1)反应液的配制

试剂	添加量	终浓度
蒸馏水	5.6 μ l	
Realtime PCR Master Mix	10 μ l	1x
上游引物 (10 μ M)	0.6 μ l	0.3 μ M
下游引物 (10 μ M)	0.6 μ l	0.3 μ M
Hybridization Probe 1(5' acceptor) (10 μ M)	0.8 μ l	0.4 μ M
Hybridization Probe 2(3' donor) (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
样品溶液	2 μ l	
Total volume	20 μ l	

- Hybridization Probe法是通过在两种探针之间实施荧光能量转移来进行的检测手段。Probe 1的5'端与acceptor荧光染料(LC-Red640等)结合，Probe 2的3'端与donor荧光染料(FITC等)结合。
- 将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。一般情况下，Probe 1的添加量要比Probe 2多得多。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。
- 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， α 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)](退火 50°C 15秒 / 延伸 75°C 30秒)

95°C 30s

↓

PCR循环 (×40循环):	
95°C	5s
50°C	15s (data collection)
75°C	30s

- 请将退火温度设定为略低于探针的 T_m 值。由于探针会发生结合，因此请将数据采集设定在退火步骤。

- 请将延伸温度设定为高于探针的T_m值。探针脱离后进行延伸。请根据引物和探针的具体情况来设定温度。
- 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**。
- 详细设置请参照仪器使用说明书。

[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循环条件、引物或探针的浓度、序列等不恰当	可通过调整引物、探针的浓度、PCR反应条件等加以改善。这些调整方法根据检测方法的不同而各有差异，请参照各试剂的实验步骤仍不能改善时，建议重新设计引物。
样品纯度不好	RNA模板可能会在RNase的作用下降解，此时，请使用RNA的专用仪器再次抽提制备RNA样品；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产生重现性差的情况。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	不纯的样品会导致实验的重现性差。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些影响。通过苯酚抽提或乙醇沉淀等方法提纯后再进行实验。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 I 处理以除去基因组DNA。
PCR循环条件、引物或探针的浓度、序列等的不恰当	扩增效率差的PCR较容易产生重现性差的情况。此时，可通过调整引物或探针的浓度、PCR其他反应条件等来改善扩增效果。若重现性很差，且无法通过提高扩增效率加以改善，则建议重新设计引物。
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。

[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	1ml x 1 (40次份)	QPK-201T
	1ml x 5 (200次份)	QPK-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。

※容量中的“反应次数”是指反应体系为 50 μl 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

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

※容量中的“反应次数”是指反应体系为 50 μl 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 1步法•Realtime PCR试剂 RNA-direct Realtime PCR Master Mix	0.5ml x 5 (100次份)	QRT-101
SYBR® Green I检测体系用 1步法•Realtime PCR试剂 RNA-direct SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	0.5ml x 5 (100次份)	QRT-201

※RNA-direct系列中，50mM Mn(OAc)₂另外单独添付。

※容量中的“反应次数”是指反应体系为 50 μl 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：