



10-10

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

(Code No.QPK-212)

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。

### NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,352, 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155, 5,677,152, 773,258, 5,407,800, 5,322,770, 5,310,652, 5,994,056, 6,171,785, and claims outside the US corresponding to US Patent No. 4,889,818. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim (such as apparatus or system claims in US Patent No. 6,814,934) and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA. A license to perform the patented 5' Nuclease Process for research is obtained by the purchase of (i) both Authorized 5' Nuclease Core Kit and Licensed Probe, (ii) a Licensed 5' Nuclease Kit, or (iii) license rights from Applied Biosystems.

※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

本产品是用于Realtime PCR的预混液，在原有SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (Code:QPK-201)基础上，通过对缓冲体系的进一步优化，使得实时定量PCR的结果具有更高的可信度和更好的重复性。

本产品包含SYBR Green I，使用未标记引物的掺入法即可简便地进行实时定量PCR。

### ◆本产品特征◆

#### 1. 高通用性

该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，该产品中添加了抗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。

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

以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

本产品在 50  $\mu$ l 反应体系情况下可用 200 次，在 20  $\mu$ l 反应体系情况下可用 500 次。

### <QPK-212>

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

### [SYBR<sup>®</sup> Green Realtime PCR Master Mix -Plus-]

• 已经包含了除引物以外所有PCR反应所需的成分，如dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、Taq DNA多聚酶、抗Taq单克隆抗体等，并且已包含了SYBR<sup>®</sup> Green I 和1 × 浓度ROX (Passive reference dye)。本品为2倍浓度的溶液。请添加样品DNA、引物、Plus solution，并用蒸馏水补足至1倍浓度。

• 本产品原则上在-20°C以下避光冷冻保存。在融解后，请缓慢颠倒，充分混匀。此外，应尽量避免反复冻融。根据本公司的经验，一般认为反复冻融10次，对产品质量没有特别大的影响。需要反复冻融10次以上的情况，可在最初融解时取一小管，剩余部分仍请置于-20°C以下冰箱避光冷冻保存。

• 如果在短期内需持续使用时，可于融解后在4°C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袋（除包装以外，另附一个铝袋，可将融解后产品装入此袋，4°C保存）。

• 建议每支产品融解后，于4°C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°C状态下进行避光冷冻保存。

### [Plus solution]

• 此溶液是提高PCR反应特异性和可靠性的组分。在通常情况下，只需添加反应溶液总量的1/10。根据目标片段的不同，适量增减可改善实验结果。因此请

根据实际情况作适当调整。

- 如手不小心接触到该溶液，请立即用大量流动清水冲洗。万一溅入眼睛，请立即用清水彻底清洗几分钟。如眼睛持续感到不适，请立即就医，接受治疗。
- 请于-20°C以下避光冷冻保存。

**为保证实验效果，请在收到产品后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®和Roche公司的LightCycler™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，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 - 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	11 $\mu$ l	
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus- Plus Solution	25 $\mu$ l 5 $\mu$ 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 -Plus-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。

- 请添加反应体系1/10体积的Plus Solution。
- 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（例2）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	3.6 $\mu$ l	
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus-	10 $\mu$ l	1x
Plus Solution	2 $\mu$ l	
上游引物 (10 $\mu$ M)	1.2 $\mu$ l	0.6 $\mu$ M
下游引物 (10 $\mu$ M)	1.2 $\mu$ l	0.6 $\mu$ 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0.4~0.8  $\mu$ 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。
- 请添加反应体系1/10体积的Plus Solution。
- 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。
- 通常将Temperature Transition Rate设为20°C/sec(最大)。但当扩增效果不理想时，尝试将Temperature Transition Rate降至2°C/sec，可改善扩增效率。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。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。

## [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	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些的影响。

### ➤ 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。同时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反应条件、引物的浓度、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。扩增不理想时, 一般可尝试降低退火温度、延长退火时间、提高引物浓度或延长延伸时间。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。
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·延伸的时间或进行三步法PCR的操作也可改善。仍得不到改善时, 建议重新设计引物。

## [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 5 (200次份)	QPK-201

※ THUNDERBIRD SYBR® 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  $\mu$ 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“反应次数”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 1步法•Realtime PCR试剂 <i>RNA-direct</i> 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 <i>RNA-direct</i> SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	0.5ml x 5 (100次份)	QRT-201

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

※ 容量“反应次数”是指反应体系为 50  $\mu$ l 时的反应次数。

[制造 · 销售商]

**东洋纺（上海）生物科技有限公司**

**上海市浦东新区张杨路 188 号汤臣商务中心 C 座 310 室**

**邮编：200122**

交货期限 · 订货相关咨询

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

E-Mail:sales@bio-toyobo.cn

产品内容 · 技术相关咨询

Tel:021-5879-4142 Fax:021-5879-5259

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

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

代理商资料：