



10-07

One-step qPCR Kit

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

(Code No.QRT-201,QRT-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。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

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.

This product is an Authorized 5' Nuclease Core Kit. 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, 5,773,258, 5,407,800, 5,322,770, 5,310,652, 5,210,015, 5,487,972, 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. Separate purchase of a Licensed Probe would convey rights under the applicable claims of US Patents Nos. 5,538,848, 5,723,591, 5,876,930, 6,030,787, 6,258,569, 5,804,375 (claims 1-12 only), and 6,214,979, and corresponding claims outside the United States. No right under any other patent claim 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 from the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

※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。

本品适用于 SYBR[®] Green I 掺入法检测。

◆ 本产品特征 ◆

1. 逆转录反应和 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，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，可以在高温下进行逆转录，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。

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。

<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 μ l 反应体系可用 40 次份（QRT-201T）和 100 次份（QRT-201）。

<QRT-201T>

<i>RNA-direct</i> SYBR [®] Green Realtime PCR Master Mix	0.5 ml x 2
50 mM Mn(OAc) ₂	0.2 ml x 1

<QRT-201>

<i>RNA-direct</i> SYBR [®] Green Realtime PCR Master Mix	0.5 ml x 5
50 mM Mn(OAc) ₂	0.5 ml x 1

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

该组分是包含反应缓冲液、SYBR[®] Green I、dNTPs、rTth DNA聚合酶及抗DNA聚合酶抗体的2×预混液。请添加模板RNA、Mn(OAc)₂和引物，并用灭菌蒸馏水配制成1×浓度后再使用。该溶液中已包含1×浓度ROX（Passive reference dye）。

50 mM 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。

该系列产品原则上在-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。

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℃状态下进行避光冷冻保存。

[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 RNA

Total RNA

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)_n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，操作时须特别小心。

[4] 使用方法

4.1 ABI PRISM®7900 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	X μ l	
<i>RNA-direct</i> SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	25 μ l	1x
50 mM Mn(OAc) ₂	2.5 μ l	2.5mM
上游引物 (10 μ M)	1.0 μ l	0.2 μ M
下游引物 (10 μ M)	1.0 μ l	0.2 μ M
样品RNA	Y μ l	
Total RNA		<2.5 μ g/50 μ l
poly(A) ⁺ RNA		<500ng/50 μ l
Total volume	50 μ l	

- 蒸馏水必须用RNase-free级别, 建议用过滤法制备的RNase-free水。如用DEPC处理过的水, 残留的DEPC会阻碍PCR反应, 因此请通过高压灭菌彻底去除DEPC。此外, 用于Realtime PCR的RNase-free水请与其它实验用水分开保存, 避免混用。
- 每种引物的添加量请在10–30pmol (终浓度0.2–0.6 μ M) 之间调整, 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。
- Mn(OAc)₂终浓度通常为2.5mM, 根据RNA样品浓度和目标序列的不同, 有时在1.5–3.5mM浓度范围内适当增减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的循环条件

[RT-PCR温度设定(例)]

变性1 90°C 30s
 ↓
 RT 61°C 20min
 ↓
 变性2 95°C 60s
 ↓

PCR循环 (×45循环):	
95°C	15s
55°C	15s
74°C	45s (data collection)

↓
 融解曲线分析(Melting Curve Analysis)

- 本品是采用 **高温热启动** 的产品，第一次变性过程 **90°C**，**30秒**后，即可充分释放酶活性，过分加热会影响酶活性及损伤模板RNA的稳定性。
- 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。
- Detector通常设为Reporter: SYBR, Quencher: None Fluorescent。Passive Reference设为ROX。详细设置请参照仪器使用说明书。
- 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）。
- 上例采用ABI PRISM® 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）。
- 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	X μ l	
<i>RNA-direct</i> SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	10 μ l	1x
50 mM Mn(OAc) ₂	1 μ l	2.5mM
上游引物 (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
下游引物 (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
样品RNA	Y μ l	
Total RNA		<1 μ g/20 μ l
poly(A) ⁺ RNA		<200ng/20 μ l
Total volume	20 μ l	

- 蒸馏水必须用RNase-free级别, 建议用过滤法制备的RNase-free水。如用DEPC处理过的水, 残留的DEPC会阻碍PCR反应, 因此请通过高压灭菌彻底去除DEPC。此外, 用于Realtime PCR的RNase-free水请与其它实验用水分开保存, 避免混用。
- 每种引物的添加量请在4–12pmol (终浓度0.2–0.6 μ M) 之间调整。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。
- Mn(OAc)₂终浓度通常为2.5mM, 根据RNA样品浓度和目标序列的不同, 有时在1.5–3.5mM浓度范围内适当增减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的循环条件

[RT-PCR温度设定(例)]

变性1 90℃ 30s
 ↓
 RT 61℃ 20min
 ↓
 变性2 95℃ 30s
 ↓

PCR循环 (×45循环):	
95℃	5s
55℃	10s
74℃	15s (data collection)

↓
 融解曲线分析(Melting Curve Analysis)

- 本品是采用**高温热启动**的产品，第一次变性过程90℃，30秒后，即可充分释放酶活性，过分加热会影响酶活性及损伤模板RNA的稳定性。
- 退火温度请根据引物的T_m值在55℃-65℃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。另外，当发现有引物二聚体等非特异性反应时，将退火步骤缩短至5秒，有可能得到改善。
- 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。
- 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）。
- 本品支持 20℃/sec 的最快升温模式。但当扩增效果不理想时，可尝试将退火和延伸步骤之间的升温速度降至 2℃/sec。
- 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。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。

➤ 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 1 (40次份)	QPK-201T
	1ml x 5 (200次份)	QPK-201
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix-Plus-	1ml x 1 (40次份)	QPK-212T
	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 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
Realtime PCR Master Mix	1ml x 1 (40次份)	QPK-101T
	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 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 <i>RNA-direct</i> Realtime PCR Master Mix	0.5ml x 2 (40次份)	QRT-101T
	0.5ml x 5 (100次份)	QRT-101

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

※容量是指反应体系为 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：