



Realtime PCR Master Mix(For Taqman)

Code No. QPK-101, 101T

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] 前言	(2)
[2] 使用注意点	(2)
[3] 本产品的组成	(3)
[4] 必需品	(3)
[5] 操作说明	(4)
1. 使用ABI PRISM®7700的TaqMan®分析.....	(4)
2. 使用Roche LightCycler™的 Hybridization Probe 分析.....	(5)
3. 添加逆转录酶的one-step RT-PCR.....	(6)
[6] 常见问题	(8)
[7] 相关产品	(9)

【 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] 前言

1. 本产品概要

本产品已包括除引物和样品DNA以外的所有组成部分，为2×Master Mix。经添加不同的探针和引物后，可以应用于由TaqMan[®]分析法、Hybridization Probe分析法等进行的Realtime定量PCR。当然，也可以应用于普通的PCR。

2. 本产品特征

· 高适用性

- 1) 本产品中添加了BSA，能够应用于Roche Diagnostic公司的LightCycler[™]以及其它使用Glass Capillary的分析体系。
- 2) 本产品中还添加了Passive reference，可应用于Applied Biosystems公司的ABI PRISM[®]7700等定量PCR仪。经确认，Passive reference不会对LightCycler[™]等产生影响。
- 3) 也可以使用BioFlux的LineGene定量PCR仪。

· 可进行高速热启动

为了抑制非特异性反应，本产品加入了抗Taq DNA多聚酶的单克隆抗体进行热启动。此方法的特征是酶活力的释放极快，变性条件下，**在1分钟内即可完成**；各循环的变性步骤与普通PCR相同。

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。

[2] 使用注意点

1. 关于使用

- 本产品为研究用试剂。请勿作为诊断、临床试剂用。另外，对于本产品的有害性调查还不十分完整。请适当使用防护用品，安全操作。
- 一经融解后，请缓慢颠倒，充分混匀。

2. 关于保存

本产品原则上在-20℃以下遮光冷冻保存。但是，如果在短期内需持续使用时，可于融解后在4℃遮光保存，此时最长可保存3周。保存时请使用遮光箱或产品内配有的铝袋(QPK-101中，除包装以外，另附一个铝袋，可将融解后产品装入此袋，4℃保存)。

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℃状态下进行遮光冷冻保存。

[3] 本产品的组成

[Realtime PCR Master Mix]

已经包含除引物以外所有的PCR反应所需的试剂，如dNTPs、MgCl₂、Taq DNA多聚酶、抗Taq单克隆抗体等。

[4] 必需品

1. 必需的试剂、仪器

[引物·探针]

请事先准备用于检出和定量对象基因序列的引物对和探针。引物和探针的设定请根据各种分析方法的特点设计。目标片段的长度也很重要，一般目标片段越长越容易产生非特异性反应，扩增效率也较低，所以目标片段最好控制在200bp以下，建议尽可能在150bp以下。

[蒸馏水]

请使用PCR用纯水。

[Realtime PCR仪]

请使用Applied Biosystems公司的ABI PRISM[®]7700、Roche Diagnostic公司的LightCycler[™]、BioFlux公司的LineGene等的Real Time PCR仪。使用方法请参照各仪器的说明书。

2. 样品DNA

[cDNA]

- 1st strand cDNA合成产物、请使用苯酚处理·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、oligo (dT) 或者特异性引物，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 No: FSK-100)，请稀释10倍以上使用。原液也可以进行扩增，但是cDNA合成时的引物或逆转录酶对PCR的定量会产生影响，因此，建议稀释后使用。

[基因组DNA等]

请使用普通PCR的DNA纯化样品。如果是人类基因组DNA，用量在1~10ng比较合适。

[5] 操作说明

1. 使用ABI PRISM[®]7700的TaqMan[®]分析法

(1) 反应液的配制

[PCR反应液(例)]

(终浓度: 引物 0.8 μ M、探针 0.2 μ M; 总体积为50 μ l)

蒸馏水	10 μ l
Realtime PCR Master Mix	25 μ l
引物 1 (10 μ M)	4 μ l
引物 2 (10 μ M)	4 μ l
TaqMan [®] 探针 (5 μ M)	2 μ l
样品溶液	5 μ l
<hr/>	
Total	50 μ l

• 将Realtime PCR Master Mix设定为总液量的1/2, 其他的组成成分请参照最适当条件改变。

另外, 如果要改变反应总体积时, 请保持最适当条件下的各组分比例。

• 引物浓度: 请在终浓度为0.2~1 μ M的范围内进行调整。

 探针浓度: 请在终浓度为0.05~0.3 μ M的范围内进行调整。

 扩增效率不高时, 可适当增加引物的用量。

• 使用商品化的引物和探针Mix时, 请参照其指定浓度。

• SNPs分型试剂也可以使用本产品。

(2) PCR的循环条件

• 下面是PCR实例。复性 / 延伸温度, 请结合引物和探针的实际情况进行调整。使用商品化引物和探针Mix时, 请参照其说明进行调整。

• 本产品可以在极短时间内释放多聚酶的活性, 因此, 最初的变性时间可以设定为60秒, 循环中变性时间可以设定为15秒。

• Realtime PCR一般不进行长片断的扩增, 所以一般不需要进行延伸时间的调整。如必须调整, 也务必确保data collection步骤至少30秒以上。

• 详细的设定请参照定量PCR仪的说明书。

[PCR循环(例1)](2步骤法、复性 / 延伸温度 60°C)

95°C 60秒

95°C 15秒

60°C 60秒(data collection)

} ×40循环

2. 使用Roche LightCycler™的Hybridization Probe分析法

(1)反应液的配制

[PCR反应液(例)](终浓度: 引物 0.3μM、探针 0.2/0.4μM; 总体积: 20μL)

蒸馏水 5.6μl

Realtime PCR Master Mix 10 μl

引物 1 (10μM)	0.6μl
引物 2 (10μM)	0.6μl
hybri probe 1(5'acceptor) (10μM)	0.8μl
hybri probe 2(3'donor) (10μM)	0.4μl
样品溶液	2 μl
<hr/>	
Total	20 μl

• Hybridization Probe分析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方法。探针1的5'端与accepter荧光色素(LC-Red640等)结合; 探针2的3'端与donar荧光色素(FITC等)结合。

• 将Realtime PCR Master Mix设定为总液量的1/2, 其他的组分请参照最适当条件调整。一般而言, 探针1比探针2稍多。另外, 改变反应总体积时, 请保持最适当条件下各组分的比例。

• 扩增效率不高时, 可以适当增加引物的用量。

(2) PCR的实施

• 复性温度设定为比探针Tm值稍低。探针与目标DNA链发生结合, 请在该步骤时收集数据。

• 延伸温度设定必须高于探针Tm值, 使目标DNA链脱离探针进行延伸。请根据引物和探针实际情况来设定温度。

• 本产品可以在极短时间释放多聚酶的活性, 因此, 最初变性时间可以设定为30秒, 各循环中的变性时间可以设定为0秒(一旦达到变性温度马上降温)。但是, 对于GC含量高的目标片段, 有时将各循环的变性时间设定为5秒较好。

• 详细的设定请参照定量PCR仪的说明书。

引物 2 (10 μ M)	4 μ l
TaqMan [®] 探针 (5 μ M)	2 μ l
RT稀释液 (ReverTra Ace [®] 3U/ μ l)	5 μ l
样品溶液	5 μ l
Total	50 μl

• 将Realtime PCR Master Mix设定为总液量的1/2，其他的组成部分请参照最适当条件调整。另外，如果要改变总体积，请保持最适当条件下的各组分比例。

• 引物或探针的浓度，请参照说明书1进行调整。扩增效率不高时，可以适当增加引物的浓度，使用商品化引物和探针Mix时，请参照其指定浓度。

(3)PCR的实施

• 在PCR循环（参照操作说明1和2）之前先进行42 $^{\circ}$ C 20分左右的逆转录反应，并将变性过程延长5分钟（使逆转录酶完全失活，避免影响PCR）。然后，参照操作说明1和2进行普通的循环。

• 以下循环为一实例。请根据引物或探针的Tm来调整复性温度。使用商品化引物和探针时，请参照指定条件进行调整。

[ABI PRISM[®]7700(例)]

42 $^{\circ}$ C 20分

95 $^{\circ}$ C 5分

95 $^{\circ}$ C 15秒

60 $^{\circ}$ C 60秒(data collection)

} \times 40循环

[6] 常见问题

1. 扩增曲线混乱

(1) PCR仪设定方面的问题(参照相应仪器的说明书)

原 因	对 策
使用了不适合探针的detector设定	适当调整detector的设定，再进行分析。
数据收集的设定不恰当	请调整设定后再进行实验。
样品位置设定错误	设定正确的样品位置后再进行分析或实验。
其他仪器方面的故障	请根据各仪器的说明书进行调整。

(2) 试剂方面的问题

原 因	对 策
PCR循环条件、引物和探针的浓度以及序列等的不恰当	可以通过改变引物和探针的浓度、循环条件来进行改善。这些调整根据不同的分析方法会有所变化，请参照相关说明书。仍得不到改善时，建议重新设计。
样品纯度不好	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影响。

2. 定量值重现性差

(1) 仪器设定方面的问题(参照相关仪器的说明书)

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发生重现性差。请根据相应仪器的说明书进行点检。

(2) 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结果重现性差。请使用混匀的样品。如样品为cDNA，逆转录酶的残留会有一些影响。用通过苯酚抽提·乙醇沉淀等方法提纯后再进行实验。
PCR循环条件、引物和探针的浓度以及序列等的不恰当	扩增效率差的PCR较容易出现重现性差的结果。通过改变引物和探针的浓度以及循环条件来进行调整。这些调整根据不同的分析方法会有所变化，请参照相关说明书。仍得不到改善时，建议重新设计。
定量结果差	加大反应的总体积再进行实验。

[7] 相关产品

品 名	包 装	Code No.	价 格
ReverTra Ace - α - [®]	50次份	FSK-100	¥700
ReverTra Ace [®]	10,000U×1本	TRT-101	¥450
	50,000U×1本	TRT-102	¥1,800
RNase Inhibitor	2,500U×1本	SIN-101	¥200
	2,500U×5本	SIN-102	¥900
SYBR [®] Green Realtime PCR Master Mix	1ml×1本	QPK-201T	¥180
	1ml×5本	QPK-201	¥650

[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