

KOD SYBR[®] qPCR Mix

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

使用说明书

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

目 录

【1】 简介.....	1
【2】 本产品的组成.....	2
【3】 其他必需品.....	3
【4】 使用方法.....	7
【5】 使用例（I） 长链 / GC Rich 目的片段的定量 PCR	14
【6】 使用例（II） 通过融解曲线对各种扩增长度进行分析.....	16
【7】 使用例（III） 通过 ASP-PCR 进行 SNP 分析.....	19
【8】 相关 Protocol: 从 RNA 样品合成 cDNA	21
【9】 常见问题.....	22
【10】 相关产品	27

【 注意 】

该系列产品为科研用试剂。请勿作为诊断、临床试剂用。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。

【 保存 】

所有组分请均保存于-20°C条件下。

※SYBR®为 Molecular Probes Inc.的注册商标。

【1】 简介

KOD SYBR[®] qPCR Mix 是基于 SYBR[®] Green I 检测体系的 Realtime PCR 用 2× 浓度的 Master Mix 试剂。本产品已将除 ROX（另外添附）和引物以外的成分预混，因此，使得反应液的配制非常简便，同时，可将样品间的荧光强度散乱控制在最小范围内，可获得很高的重复性。

本产品通过将去除 3'→5' 核酸外切酶活性（校正活性）的 KOD exo(-) DNA polymerase 和组分最适化的 buffer 相结合，使得 KOD 出色的合成能力和不易受粗样品抑制的能力在掺入法检测（SYBR[®] Green I）中得到最大限度的发挥。

◆ 本产品特征 ◆

1. 可用于长片段（~2kb）

可对用以往 Realtime PCR 试剂难以扩增的 500bp~2kb 的目的片段进行定量的扩增。因此，对于为 KOD FX 系列、KOD -Plus- 系列等常用的 PCR 设计的引物可直接使用。此外，由于可扩增至 2kb 的目的片段，引物的选择范围变得更大。而且，由于可选择各种长度的目的片段，因此对于 T_m 值不同的扩增产物的设计变得更容易，可对更广范围的融解曲线进行分析。本产品的这些特性，可在使用 end point assay 的多重分析中得到充分发挥。

2. 可用于使用粗样品的 end point 分析

可使用粗样品（右表）进行扩增。因此，最适用于直接使用裂解液的基因分型。

粗样品例

血液	终浓度 1.0% 左右
指甲	1mm 左右
头发	从发根开始 1~2cm
口腔粘膜	取样后、水悬浊液
培养细胞	~10 ³ 细胞
动物组织	碱裂解液
植物组织	裂解液 (终浓度 1% 以下)

3. 对高 GC 含量的目的片段非常有效

通过使用 KOD DNA polymerase，即便是用以往产品难以扩增的 GC 含量超过 70% 的目的片段也可进行定量的扩增。

4. 高特异性

通过组分最优化，提高了 PCR 的特异性。通过抑制引物二聚体等非特异性反应，即便是低拷贝条

件下也能得到更广的可定量区域。

5. 可适应各种仪器

除适用于普通及高速的模块型 (Block Type) 仪器, 也可用于玻璃毛细管型 (Glass Capillary Type) 高速 Realtime PCR 仪。此外, 由于另外添附了 50×ROX reference dye, 对于使用 Passive Reference 的仪器 (如 Applied Biosystems 公司制造的仪器), 可根据各种仪器的特征把 ROX 浓度调到最适值。

【2】 本产品的组成

本产品包含以下试剂

品名及内容	保存	容量 (QKD-201)	容量 (QKD-201T)
KOD SYBR [®] qPCR Mix	-20°C (或在 2~8°C 条件下 3 个月以内) 避光保存	5ml (1.67ml×3)	1ml (1ml×1)
50× ROX reference dye	-20°C (或 2~8°C) 避光保存	250µl	50µl

KOD SYBR[®] qPCR Mix

- 该组分是包含反应缓冲液、SYBR[®] Green I、dNTPs、Mg²⁺、KOD exo(-) DNA polymerase 及抗 DNA 聚合酶抗体的 2× 预混液。请添加模板 DNA (cDNA、genomic DNA、plasmid DNA 等) 和引物溶液, 并用灭菌蒸馏水配制成 1× 浓度后再使用。
- 该溶液中不包含 ROX (passive reference dye)。
- 收到产品后, 请立即置于 -20°C 冷冻保存。
- 初次使用时, 请先将其融解, 然后轻轻地颠倒混合, 使溶液完全均一后再使用。如果在短时间内要持续使用时, 可在 2~8°C 条件下冷藏保存, 并在 3 个月内使用完毕。
- 融解后的产品短期内不用时, 请装入原包装袋, 再次于 -20°C 冷冻保存。经确认该组分反复冻融约 10 次对品质没有影响。

- 为防止 SYBR[®] Green I 的荧光淬灭，请避光保存。

50×ROX reference dye

· 以 Applied Biosystems 公司、Agilent Technologies 公司制造的仪器为代表，为校正各孔间的荧光强度及分注误差，在使用 Passive Reference 的仪器进行反应时，请添加 ROX。最适添加量根据仪器种类的不同而不同。几种主要仪器的添加量请参考[4] 使用方法（1）反应液的配制。

- 不用 Passive Reference 进行校正的仪器无需添加 ROX。
- 请在-20°C 或 2~8°C 条件下避光保存。
- 长时间不使用时，请于-20°C 冷冻避光保存。

※ROX reference dye 固定使用同一浓度时，也可将 50×ROX reference dye 预先与 KOD SYBR[®] qPCR Mix 混合后保存。混合后请轻轻颠倒混匀，然后按上述 KOD SYBR[®] qPCR Mix 的保存条件保存。混合比例如下。ROX 的浓度请参考[4] 使用方法（1）反应液的配制。

1×ROX 浓度

qPCR Mix : 50×ROX = 1.67ml : 66.8μl (QKD-201) / 1ml : 40μl (QKD-201T)

0.1×ROX 浓度

qPCR Mix : 50×ROX = 1.67ml : 6.7μl (QKD-201) / 1ml : 4μl (QKD-201T)

【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。

(2) 引物

请准备与目的基因序列相对应的引物。在使用 SYBR[®] Green I 的掺入法检测中引物的特异性非常重要。而为 KOD -Plus-系列、KOD FX 系列、KOD Dash 等普通 PCR 设计的扩增片段长达 2kb

的高特异性引物，基本上也可直接使用。

以下列举了设计引物时需注意的一般事项。

- 引物请设计在扩增长度 2kb 以下。
- 引物的融解温度（melting temperature: T_m^{*1} ）请设定在 60~70°C 的范围内。融解温度根据计算方法不同而有所差异，但请以 60~70°C 为基准进行考虑。

- GC 含量为 45~60%。

- 请注意不要使其形成引物二聚体。其中，以下三种情况很容易产生引物二聚体，请尽量避免。

① Forward、Reverse 引物的 3' 末端相互补

② 引物的 3' 末端附近 GC 含量很高

③ 引物内含有相互补的序列

- 3' 末端设计为 G 或 C 可提高引物与模板结合效率。但如前所述，如果 GC 过于偏向 3' 端，则容易出现非特异性反应。

- 以 cDNA 为目的片段时，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。

此外，引物的纯化程度对反应特异性有很大的影响。经过一般纯化、纯度较低的引物荧光强度散乱，容易产生非特异性产物。请尽可能使用 HPLC 级别纯化，至少要用经 Cartridge (OPC) 级别以上纯化的引物。

*1: 引物 T_m 值的计算请使用最邻近法 (Nearest Neighbor method)。本说明书中所记载的引物 T_m 值是在 50mM Na^+ 浓度和 0.5 μ M 寡聚核苷酸浓度条件下计算而得。

(3) 模板 DNA

用本产品，cDNA、genomic DNA、plasmid DNA、virus DNA 等各种 DNA 及一部分粗样品都可作为模板使用。但含尿嘧啶的模板不能使用。

(a) cDNA

- 将普通逆转录反应试剂合成的 cDNA，无需纯化，用灭菌水等适当稀释后可直接添加到

RealtimePCR 反应液中。

· 添加量不应超过总反应体系的 10%^{*1}。过量添加会大大改变 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: FSQ-101)、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix(Code : FSQ-201)、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Code : FSQ-301)，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，即便在 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。

^{*1}: 市售的某些逆转录反应用试剂不是专门针对荧光定量PCR设计的，此时添加量应小于总反应体系的10%。

(b) genomic DNA、virus DNA

- genomic DNA、virus DNA 也可以作为模板使用。
- 添加量以每 50 μ l 反应体系 200ng^{*2} 为上限。

^{*2}: 由于SYBR[®] Green I具有和双链DNA分子结合发光的特性，在以大量的双链DNA为模板的情况下，SYBR[®] Green I与模板DNA自身相结合，会造成基线上飘。因此，在以genomic DNA为模板时，在高浓度区域会出现直线性低下的情况。

(c) plasmid DNA

- plasmid DNA 也可作为模板使用。
- 如果直接使用环状 plasmid DNA，容易导致扩增效率低下，从而不真实地反应拷贝数^{*3}。因此，请使用限制酶将其切断，线性化后再使用。
- 当稀释纯化过的 plasmid DNA 溶液时，溶液中的 DNA 浓度会变得非常低，DNA 容易被容器吸附。因此，进行 Realtime PCR 时，会造成低浓度区域的线性和重现性低下。如果在稀释时，将与反应无关的核酸（yeast RNA 等）作为掺入物与稀释液混合，可改善低浓度区域的线性。

*3: plasmid DNA的拷贝数，可用以下简易公式计算。

$$\text{每1}\mu\text{g plasmid DNA的拷贝数} = 9.1 \times 10^{11} / \text{plasmid DNA的大小 (kb)}$$

(d) 粗样品

将活体组织等粗样品添加到 PCR 反应液中时，请参照以下的添加量。过量添加会导致反应性低下，请务必注意。

●end point检测时可确认到扩增的添加量（20 μ l反应体系时）

全血	稀释至1/10、添加2 μ l
指甲	按米粒的1/3大小、直接添加
头发	从发根处开始1~2cm、直接添加
口腔粘膜	用棉棒取样后，在200 μ l水中悬浊、向反应液中添加5 μ l
培养细胞	~10 ³ cells
动物组织	碱裂解液*1
植物组织	一步法得到的植物裂解液*2

*1: 碱裂解液按以下方法配制。

活体样品（添加量参照右图）

- ↓ ←添加50mM NaOH 180 μ l
- ↓ Vortex充分振荡
- ↓ 95°C、10分钟温育
- ↓ ←用1M Tris-HCl(pH8.0) 20 μ l中和
- ↓ Vortex充分振荡
- ↓ 离心 12,000rpm、5分钟（optional）

在20 μ l反应体系中添加上清0.5 μ l~2 μ l
（活体样品不会也无需完全溶解）

活体样品例

鼠尾	约 3mm
猪肉	约 20mg
牛肉	约 20mg
指甲	约 5mg

*2: 植物裂解液按以下方法（一步法）配制。

植物（稻叶、烟草叶、米粒等）（约3mm的小块）

- ↓ ←添加Buffer A 100 μ l
- ↓ Vortex充分振荡
- ↓ 95°C、10分钟温育
- ↓ Vortex充分振荡

用灭菌水将上清稀释至1/10

↓

在20 μ l反应体系中添加上清0.5 μ l~2 μ l

Buffer A

100mM Tris-HCl (pH9.5)
1M KCl
10mM EDTA

在Buffer A中，通过使用Pestle对植物组织进行匀浆，可提高效率。此时，不需要加热。

【4】 使用方法

(1) 反应液的配制

以下为 50 μl 及 20 μl 反应体系时的配制例。请根据使用的 Realtime PCR 仪的特性, 适当增减反应液量。

试剂	50 μl 反应体系	20 μl 反应体系	终浓度
灭菌水	X μl	X μl	
KOD SYBR [®] qPCR Mix	25 μl	10 μl	1 \times
Forward Primer	10 pmol	4 pmol	0.2 μM^{*1}
Reverse Primer	10 pmol	4 pmol	0.2 μM^{*1}
50 \times ROX reference dye	1 / 0.1 μl	0.4 / 0.04 μl	1 \times / 0.1 \times^{*2}
DNA溶液	Y μl	Y μl	
合计液量	50 μl	20 μl	

*1: 扩增效率不充分的情况下, 可提高引物浓度, 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度, 从而改善反应结果。引物浓度, 请以终浓度0.05~1.0 μM 为标准进行探讨。

*2: Applied Biosystems公司的仪器, Agilent Technologies公司的仪器等, 为校正各孔间的荧光强度及分注误差而使用了Passive Reference。因此使用这些仪器时请添加ROX reference dye。最适添加量根据仪器种类的不同而有所差异, 几种主要仪器的添加量如下。不用Passive Reference进行校正的仪器无需添加。

表1: 几种主要仪器的最适ROX reference dye浓度

仪器	终浓度 (添加量)
Applied Biosystems 7000、7300、7700、7900HT、StepOne™、StepOnePlus™ 等	1 \times (1/50量)
Applied Biosystems 7500、7500Fast、Agilent Technologies公司生产的仪器 (Option) 等	0.1 \times (1/500量)
Roche公司生产的仪器、Bio-Rad公司生产的仪器、BioFlux LineGene 等	不添加

此外，长期稳定地使用 ROX reference dye 同一浓度的情况下，可预先按以下比例将 50× ROX reference dye 与 KOD SYBR[®] qPCR Mix 混合后保存。

ROX 按 1× 浓度使用时

qPCR Mix : 50× ROX = 1.67ml : 66.8μl (QKD-201) 或 1ml : 40μl (QKD-201T)

ROX 按 0.1× 浓度使用时

qPCR Mix : 50× ROX = 1.67ml : 6.7μl (QKD-201) 或 1ml : 4μl (QKD-201T)

(2) PCR循环条件的设定

(a) 推荐的PCR循环条件

首先，建议以以下的条件进行PCR。反应特异性较低，或扩增效率较低时，再按「(b) PCR循环条件探讨方法」中记载的方法摸索条件。

Step温度	时间	升降速度
预变性 98°C	2分钟* ¹	最大
变性 98°C	10秒	最大
PCR退火 60°C* ²	10秒	最大
(40 cycles* ⁴) 延伸 68°C	30秒/500bp* ³ (500bp以下30秒) (Data Collection设定在延伸步骤)	最大
融解曲线分析 (Melting / Dissociation Curve Analysis) * ⁵		

*¹: 本产品由于采用了使用抗体的热启动系统，需进行98°C、2分钟的预变性，使抗体热变性。

*²: 无法得到充分的扩增效率的情况下，可将退火温度设定得低一些（~50°C），发生非特异性反应时，可将退火温度设定得高一些（~68°C），从而改善反应结果。

*³: 一般情况下，标准序列目的片段在500bp以下时，延伸时间30秒即可进行充分的反应。但一部分仪器为测定稳定的荧光，延伸时间需大于30秒。扩增曲线散乱，或各孔间的差异较大时，请设定较长的延伸时间（45-60秒）。另外，部分仪器由于硬件或控制用的软件原因，无法设定为30秒，此时请根据仪器的使用说明书，设定最适的可设定时间。标准序列目的片段在500bp以上时，延伸时间按目的片段链长30秒/500bp设定。

*4: 检测粗样品时, 有时会出现起峰值 (Ct值) 很低的情况。此时, 在特异性不影响的范围内增加循环数 (~50 cycles), 可改善检测灵敏度。

*5: 在 SYBR® Green I 检测体系中, 通过将 SYBR® Green I 和 DNA 扩增产物结合, 以该荧光强度的增大为指标, 进行检测。虽然与普通的 PCR 进行同样的反应非常简便, 但由于会检测出引物二聚体及非特异性的扩增产物, 需要在扩增后通过融解曲线分析进行确认。融解曲线分析的设定请按各仪器的标准进行设定。详细请参照各仪器的使用说明书。

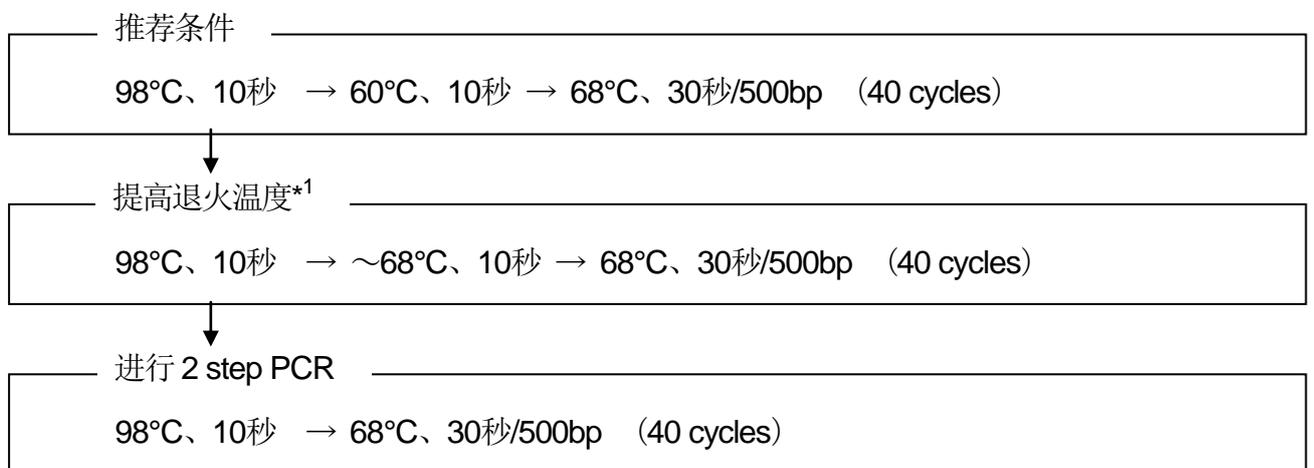
目的片段的GC含量超过80%时, 根据仪器的不同, 有时会发生融解曲线中途无法检测到的情况, 此时, 请进行电泳以确认特异性。将融解温度的上限设定为99°C可解决该问题。

(b) PCR循环条件探讨方法

反应特异性较低或扩增效率较低(无法确认扩增)时, 请按以下方法摸索PCR循环的最适条件。

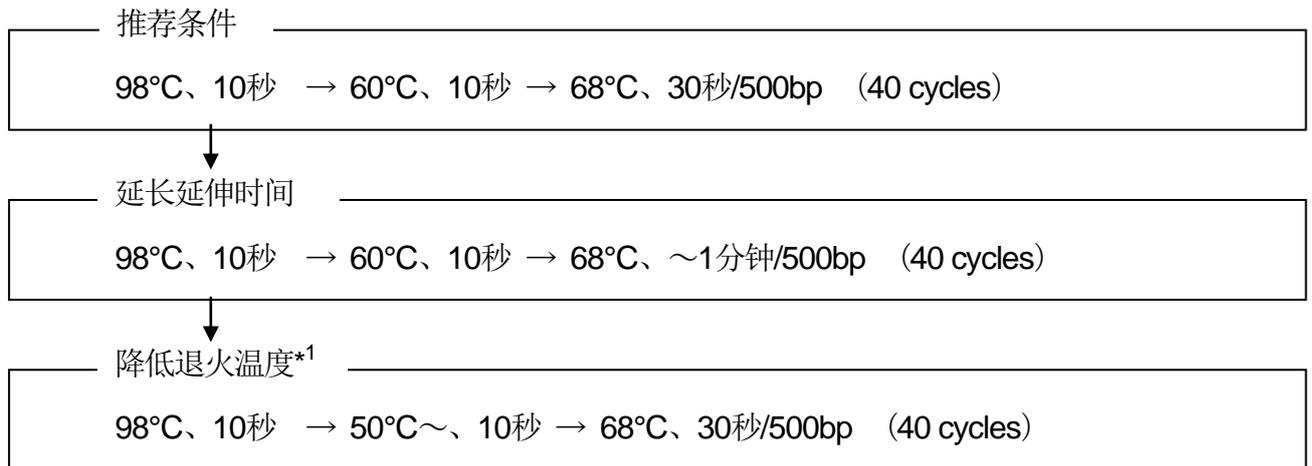
●反应特异性较低时

可通过提高退火温度及2 step PCR来改善反应特异性。此时, 请在确认与扩增效率平衡性的同时, 来决定最适的退火条件。



●扩增效率较低(无法确认扩增)时

可通过延长延伸时间、降低退火温度来改善扩增效率。此外, 有时也可通过增加引物量来改善扩增效率。



*1: 摸索退火温度时, 可通过使用ABI StepOnePlus™的VeriFlex™功能、Bio-Rad公司仪器的温度梯度功能, 一次运转可探讨几个退火温度, 从而使得摸索条件更加简便。

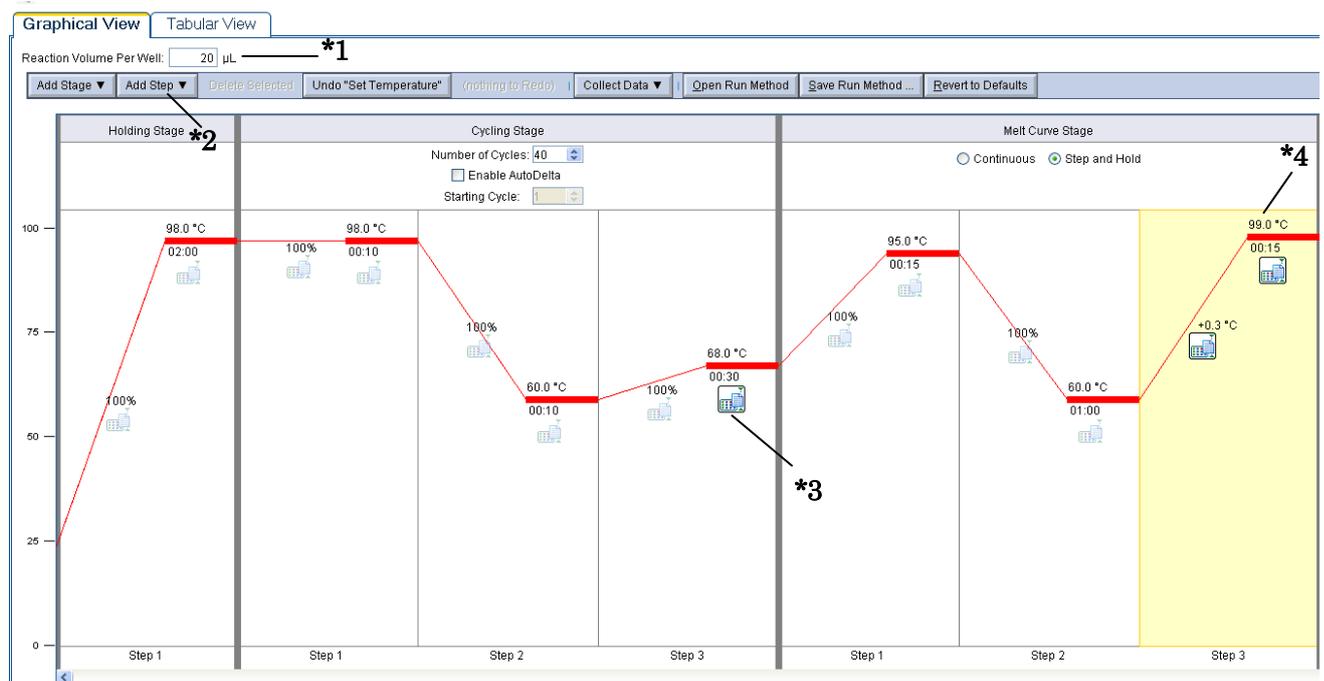
(3) -1 Applied Biosystems StepOnePlus™循环条件设定例
(普通的Block type、软件版本2.2.2)

以下为在Applied Biosystems StepOnePlus™上使用本试剂的循环条件设定例。

- ① 启动软件, 选择Design Wizard、Advanced Setup、QuickStart中的其中之一。
- ② 选择下表的标签, reagents选择SYBR® Green Reagents。

Design Wizard	Methods & Materials
Advance Setup	Setup → Experiment Properties
QuickStart	Experiment Properties

- ③ 选择Run Methods, 如下所示设定温度条件。



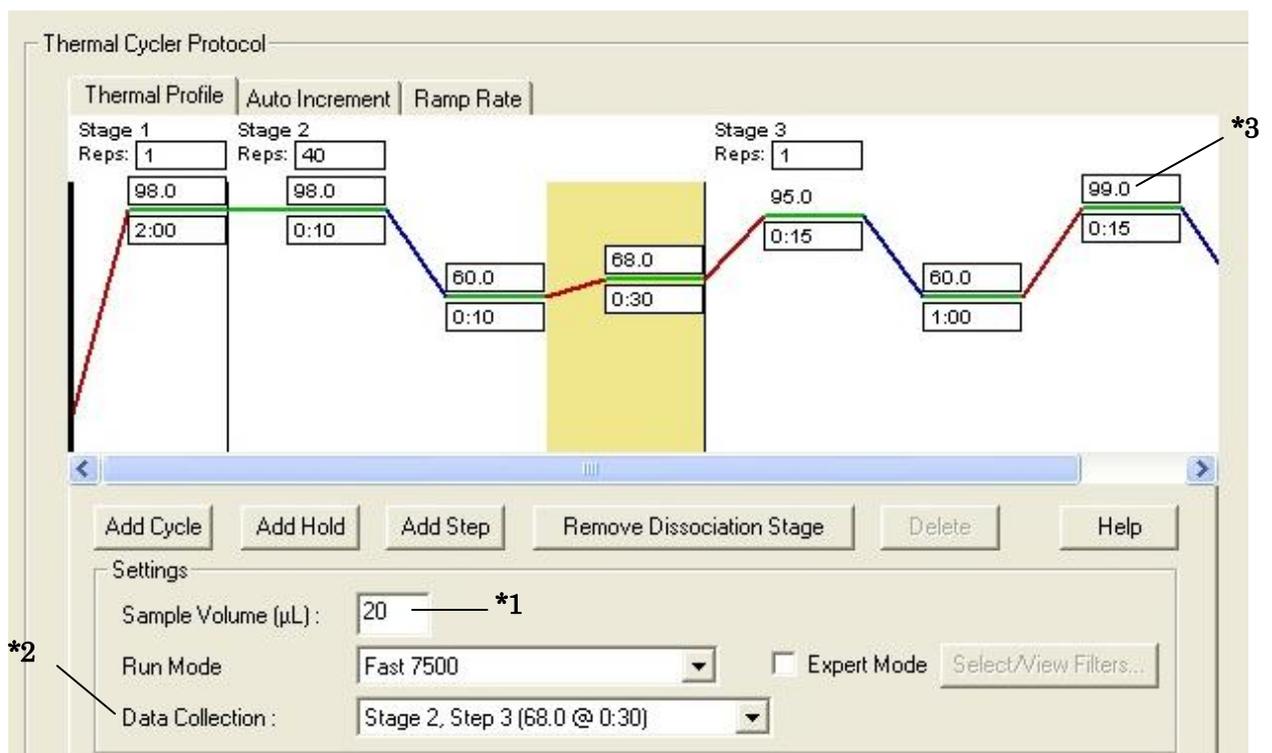
- *1: Sample Volume (μL)栏中，请务必输入正确的反应液量。
- *2: 由于初期设定为2 step，请选择Add Step，变更为3 step。
- *3: 延伸反应时请设定为数据回收point。
- *4: 请添加制作融解曲线用的循环。GC含量较高时，融解温度的上限请设定为99°C。

④在正确的位置放置PCR板和离心管，就可以开始PCR反应了。

(3) -2 Applied Biosystems 7500 Fast Real Time System循环条件设定例 (普通的Block type、软件版本1.4)

以下为在Applied Biosystems 7500 Fast Real Time System上使用本试剂的循环条件设定例。

- ① 启动软件，选择Instrument标签。
- ② 如下所示设定温度条件。



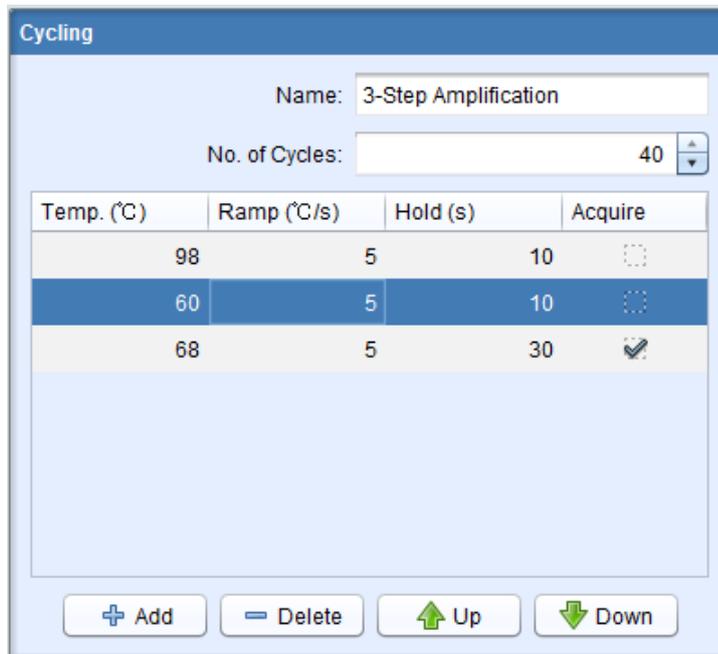
- *1: Sample Volume (μL) 栏中，请务必输入正确的反应液量。
- *2: 延伸反应时请设定为数据回收point。
- *3: 请添加制作融解曲线用的循环。GC含量较高时，融解温度的上限请设定为99°C。目的片段的GC含量超过80%时，会出现融解曲线中途无法检测到的情况。

②在正确的位置放置PCR板和离心管，就可以开始PCR反应了。

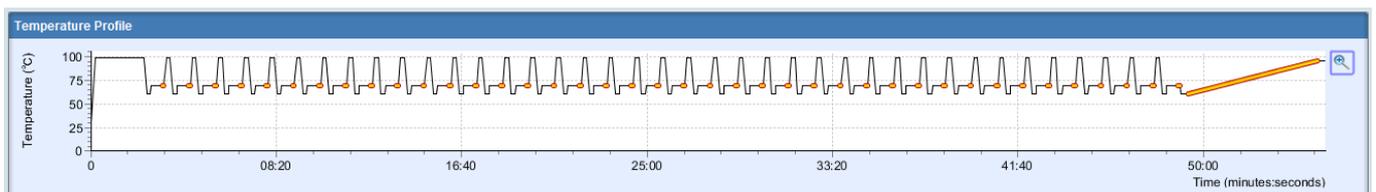
(3) -3 Roche LightCycler® Nano循环条件设定例
(软件版本1.0)

以下为在Roche LightCycler® Nano上使用本试剂的循环条件设定例。

- ① 启动软件，选择New键。
- ② 打开Experiment标签，在Name中记载实验名。
- ③ 打开Run Settings标签，选择Intercalating Dyes。
- ④ 打开Profile标签，如下设定温度条件。
 - A) 按Program的add按钮，选择Hold。
 - B) 温度条件变更为98°C、120秒、5°C/秒。
 - C) 按Program的add按钮，选择3-step Amplification。
 - D) 如下所示设定温度条件。
 - E) 请确认延伸反应时Acquire有check。



- F) 按Program的add按钮，选择Melting。
- G) 请确认是否已按如下所示设定程序。

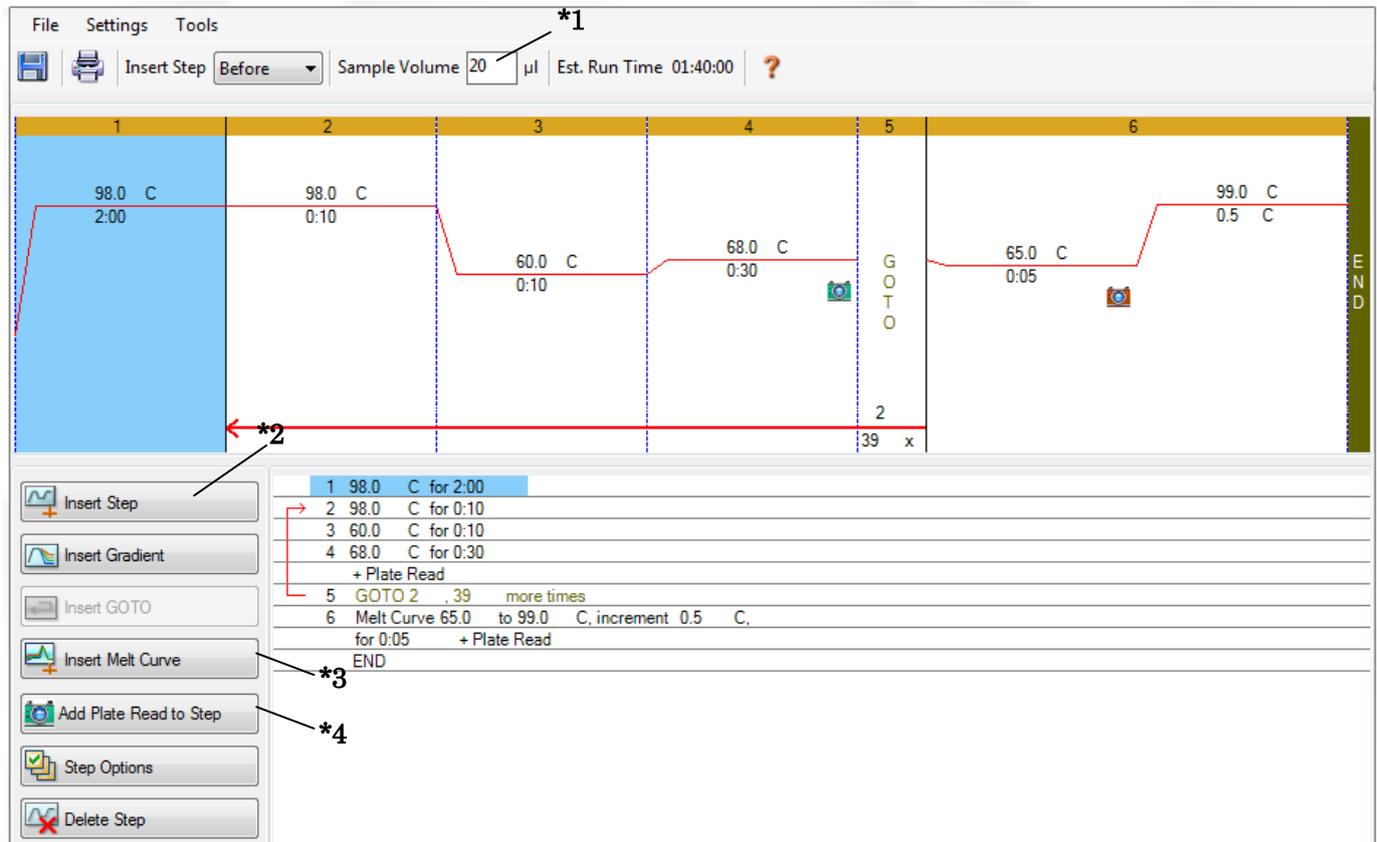


- ⑤ 在正确的位置放置PCR板和离心管，就可以开始PCR反应了。

(3) -4 Bio-Rad MiniOpticon循环条件设定例 (软件版本2.0)

以下为在Bio-Rad MiniOpticon上使用本试剂的循环条件设定例。

- ① 启动软件，选择Create a new run。
- ② 选择Create New...，按如下所示设定温度条件。



*1: Sample Volume (µl) 栏中，请务必输入正确的反应液量。

*2: 由于初期设定为2 step，请选择、Insert Step，变更为3 step。

*3: 选择Insert Melt Curve，追加制作融解曲线用的循环。GC含量较高时，融解温度的上限请设定为99°C。

*4: 延伸反应循环请选择Add Plate Read to Step，设定数据回收point。

- ③ 在正确位置放置PCR板和离心管，就可以开始PCR反应了。

【5】使用例（I） 长链 / GC Rich 目的片段的定量 PCR

实验例1：长链目的片段

【方法】

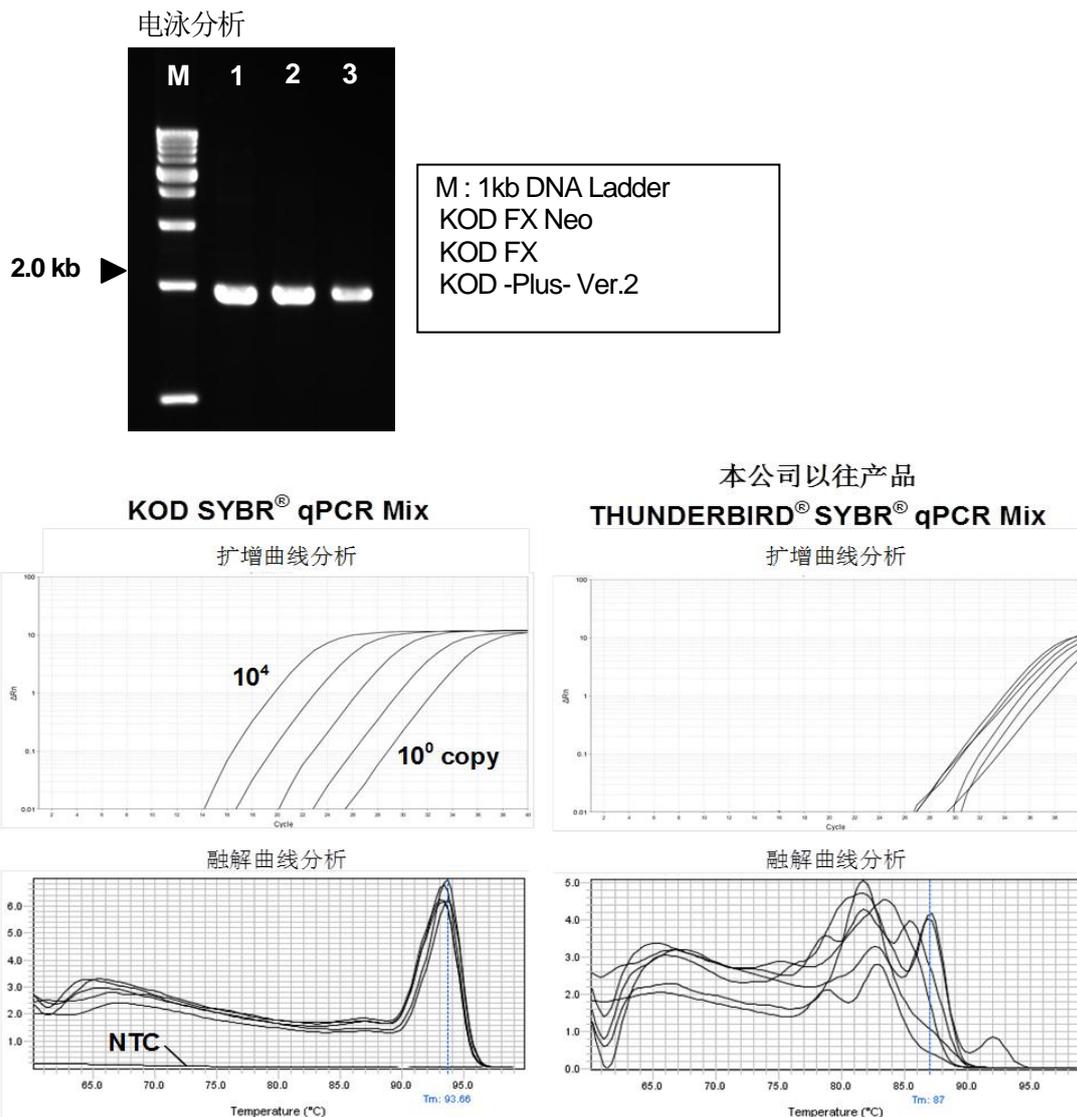
直接使用为KOD FX系列、KOD -Plus-系列等普通PCR用设计的引物，用以往产品和本产品对TGF β 的长链目的片段（1.9kb）进行反应性的比较。模板使用Human genomic DNA（gDNA），gDNA的10倍稀释（5个梯度）和no-template control（NTC），进行反应。

PCR循环条件：98℃，2分钟 → 98℃，10秒 / 60℃，10秒 / 68℃，120秒（40 cycles）
※延伸时间设定为30秒 / 500bp

仪器：ABI StepOnePlus™

【结果】

即便是使用Taq DNA polymerase的本公司产品（THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix）难以扩增·定量的1.9kb的长链目的片段，用本产品也能确认到扩增。



实验例2 : GC Rich目的片段

【方法】

用各Realtime PCR试剂对GC含量超过70%的目的片段进行反应性的比较。模板使用本公司高效率逆转录试剂盒「ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Code: FSQ-101)」合成的源于HeLa细胞total RNA的cDNA, cDNA 5倍稀释 (5个梯度), 进行反应。PCR循环条件使用各试剂推荐的条件。

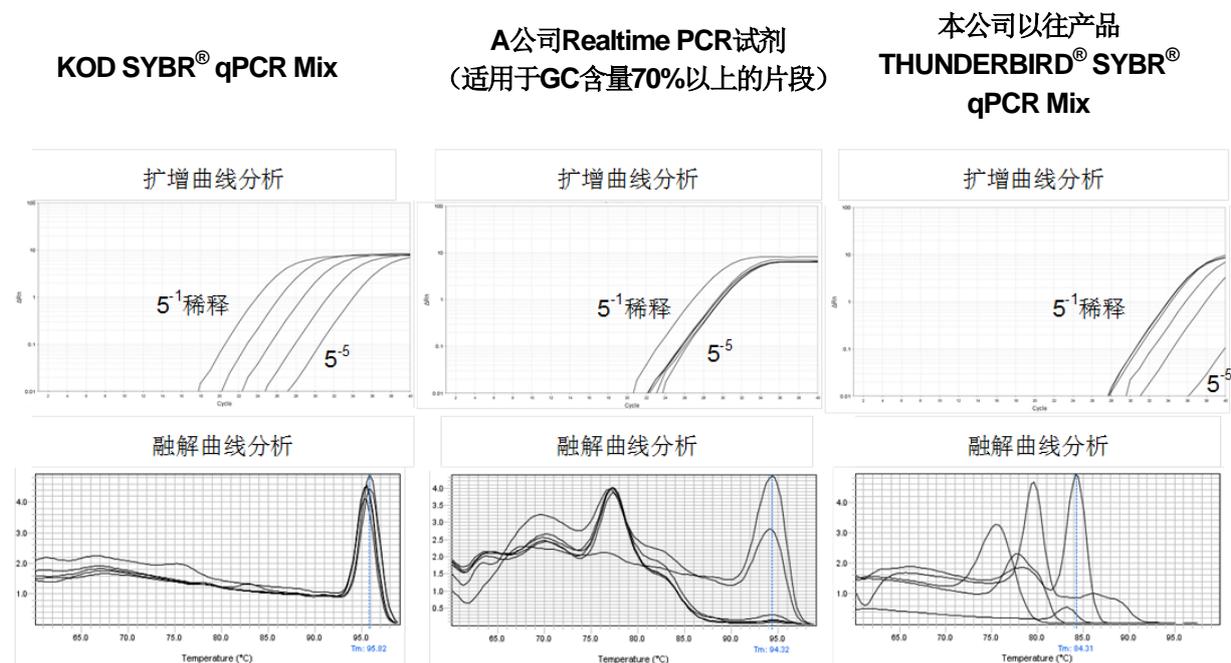
本产品的PCR循环条件: 98°C, 2分钟 → 98°C, 10秒 / 60°C, 10秒 / 68°C, 30秒 (40 cycles)

仪器: ABI StepOnePlus[™]

【结果】

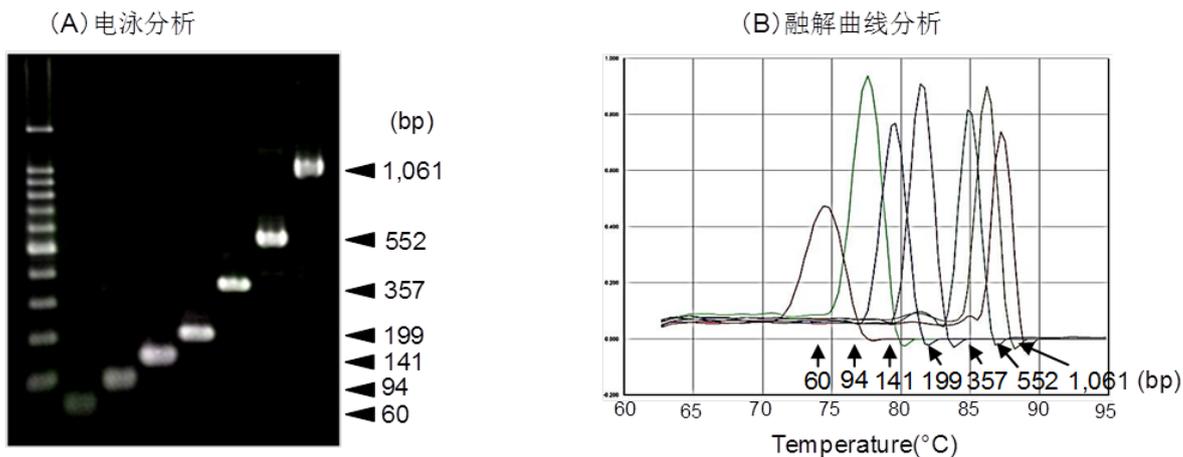
即便是用本公司以往产品 (THUNDERBIRD[®] SYBR[®] qPCR Mix) 难以扩增的GC含量超过70%的目的片段, 用本产品也能确认到定量的扩增。另外, 用其他公司产品会确认到引物二聚体, 而用本产品不容易产生, 因此在低拷贝区域也能得到范围很广的定量。

目的片段: IGF2R基因 (GC含量83% / cDNA)



【6】 使用例（Ⅱ） 通过融解曲线对各种扩增长度进行分析

由于KOD SYBR® qPCR Mix可选择长至2kb的各种目的片段，如下图，可通过扩增长度不同使得扩增产物的T_m值产生差异。因此，在计算上，可通过在T_m值*¹产生差异的区域设计数个引物，从而可在单管中进行Multiplex PCR、扩增长度不同的目的片段等。该Multiplex PCR中的峰值识别，T_m值的间隔在3°C以上（根据仪器种类的不同，有时可能是5°C以上）时可进行分析。



(C) 扩增长度和预测以及实测T_m值

扩增长度 (bp)	预测T _m 值* ¹ (°C)	实测T _m 值* ² (°C)
60	72	74
94	76	77.5
141	79	79
199	82	82
357	84	85
552	86	86
1,061	88	87

使用KOD SYBR® qPCR Mix，用各种引物对人β-actin基因进行扩增。

- (A) 扩增后，进行电泳。
- (B) 扩增后，进行融解曲线分析，求T_m值的实测值。
- (C) 比较扩增产物的实测T_m值和预测T_m值。

*¹：扩增产物的T_m值按以下公式估算。

$$T_m = 64.9 + 41 \times (yG+zC-16.4) / (wA+xT+yG+zG)$$

※w、x、y、z为扩增产物中A、T、G、C的各碱基数

Wallace RB *et al.* (1979) *Nucleic Acids Res* 6:3543-3557

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.

※本公司已将基于上述方法的T_m值计算表格公布在网站上，请登录本公司中文网站www.bio-toyobo.cn下载。

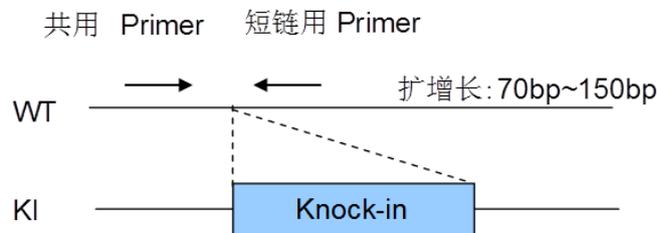
*²：有时会出现预测T_m值和实测T_m值不一致的情况。

以下为利用各种扩增长度对Knock-in小鼠进行基因分型检测的引物设计应用例。在该方法中，通过调整目的片段长度使得两个扩增产物的T_m值产生差异，可进行Multiplex PCR。

【基因分型用引物的设计方法（一端共用引物的设计方法）】

①短链目的片段的设定

为了和引物二聚体相区别，请将引物设计为扩增产物70bp~150bp。下图为Wild type (WT) 作为短链侧的例子，但Knock-in (KI) 为短链侧也没有关系。

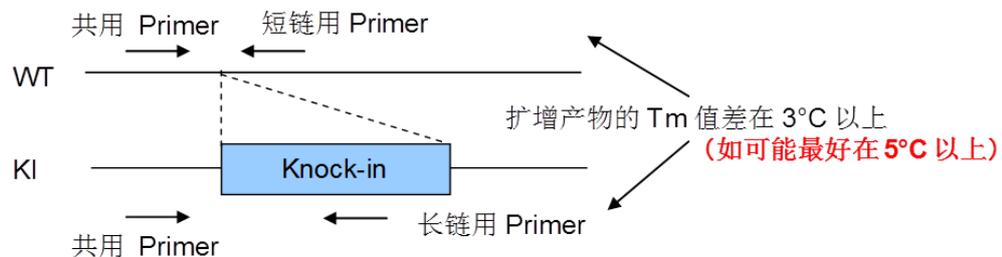


②短链扩增产物 Tm 值的计算

计算扩增长度为70bp~150bp的短链扩增产物的Tm值（参考P16）。

③长链目的片段的设定

长链目的片段扩增产物的Tm值设计为比①设计的短链扩增产物高3°C以上（如有可能，最好是5°C以上）。考虑到扩增效率的平衡，应将扩增长度设计为500bp以下（最好是300bp左右）。此时，如不能将Tm值的差设计为3°C以上，请将短链目的片段的扩增长度设计得更短些。



④使用实际设计的引物的预实验

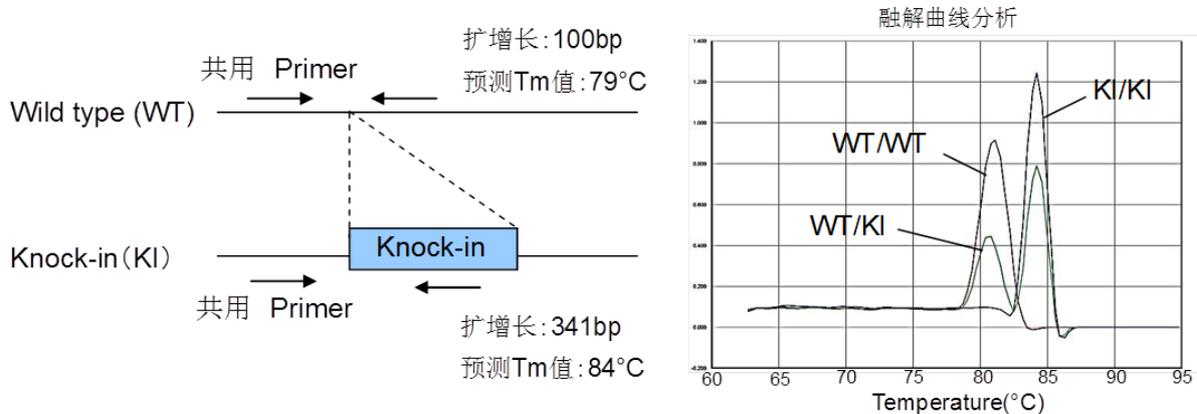
这里主要的问题是异质体的检测。在SYBR[®] Green I Assay中，信号强度不是与扩增产物的摩尔数，而是与扩增产物的量（链长）成比例。因此，请按以下计算公式决定PCR时的引物量。

<引物浓度设定>

	引物浓度 (μM)
长链用引物	$0.2\mu\text{M} \times (\text{短链扩增产物长}[\text{bp}] \div \text{长链扩增产物长}[\text{bp}])$
共用引物、短链用引物	0.2μM

【结果】

按照以上流程，摸索引物设计、引物比，结果可知，Reverse侧的引物比在长链：短链=1：3的情况下，可获得良好的分析。



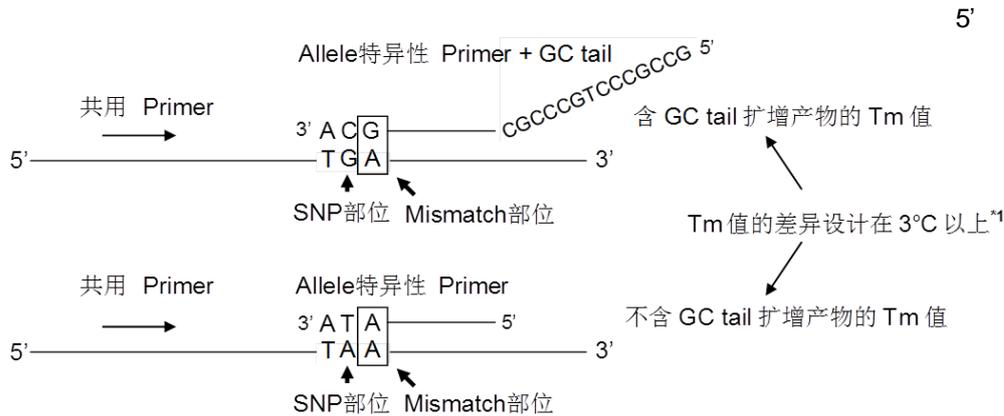
【7】 使用例（Ⅲ） 通过 ASP-PCR 进行 SNP 分析

即便扩增片段长度相同，通过在特定的引物5'端添加高GC含量的tail序列（GC tail），可将特定扩增产物的Tm值提高3~5°C。用该方法，可在单管内使用ASP(Allele specific primer)-PCR法进行SNP(Single-nucleotide polymorphism)分析。ASP-PCR方法在添加GC tail以外，和普通的ASP-PCR一样。通过将引物设计为3'末端（附近）为SNP部位，可分析扩增的有无。

【GC tail 引物的设计方法】

- 为了通过GC tail使Tm值上升的效果显著，应将扩增长度设计为100bp以下。
- 可应用于各种原理的ASP-PCR。在实验例4（下例）中，SNP部位可设计在3'末端第二碱基，mismatch部位设计在第三碱基。第三碱基的mismatch，可以选择任何与A相互补的T以外的任何碱基。下例中，分别为G和A。
- 设计好之后，请确认两种扩增产物的Tm值差异是否在3°C以上*1。不满3°C的情况下，请缩短扩增长度。
- GC tail请参考下图添加。在Tm值产生差异的范围内，可改变GC tail的长度。可参考各种关于GC tail的论文。
- 扩增后，峰值的平衡不好的情况下，请参考【基因分型用引物的设计方法】(P.17)探讨引物比。

【为SNP检测的引物设计例】



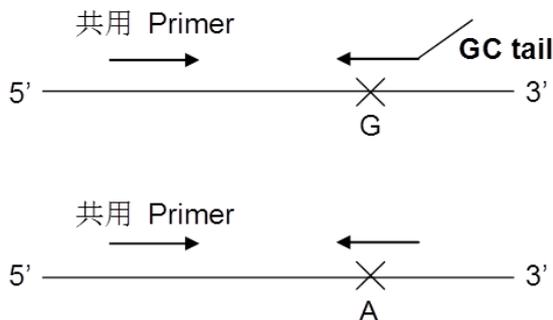
*1：根据仪器种类的不同，有的smoothing功能可将相邻的两个峰值表示为一个范围比较广的峰值。此时，请将引物设计为Tm值的差在5°C以上。为了将Tm值的差设计在5°C以上，建议将扩增长度设计得短一些（50bp~60bp左右）。

实验例4：血液、口腔粘膜的检测 ~ALDH2 SNP的检测~

【方法】

血液、口腔粘膜的DNA不进行纯化，在单管中进行ALDH2（aldehyde dehydrogenase2）SNP的检测。

SNP检测时，由于扩增片段长度相同，通过在一侧的Allele特异性引物中添加GC tail，将扩增产物的Tm值设计为产生差异。



ALDH2 SNP 部位的序列

Allele	Sequence
487Glu	5'-ctgcaggcatacact <u>GAA</u> gtgaaaactgtga-3'
487Lys	5'-ctgcaggcatacact <u>AAA</u> gtgaaaactgtga-3'

Primer	Sequence	扩增长	预测 Tm 值
共用引物	5'-GTACGGGCTGCAGGCATAC-3'	—	—
G 特异性引物	5'- <u>GCCGCCCTGCCCGCC</u> ACACTCACAGTTTTCACT <u>GCA</u> -3'	57bp	78°C
A 特异性引物	5'-CCCACACTCACAGTTTTCACT <u>ATA</u> -3'	45bp	72°C

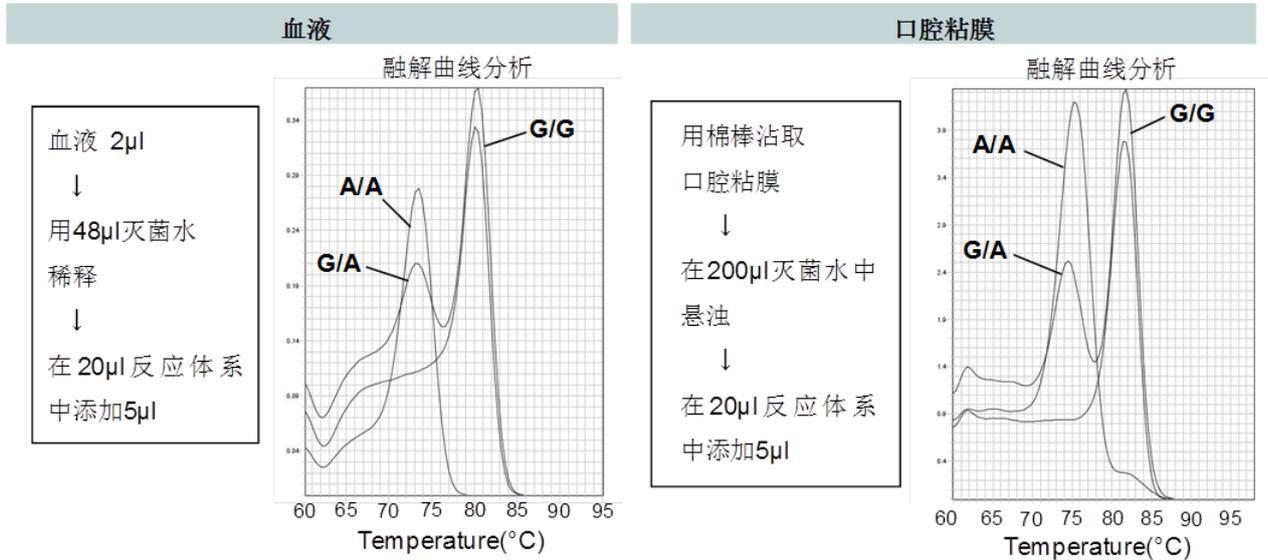
※下划线:GC tail、C or T:SNP 部位、G or A: Mismatch 部位

按如下条件配制模板，直接添加到反应液中。

PCR循环条件：98℃,2分钟 → 98℃,10秒 / 60℃,10秒 / 68℃,30秒 (50 cycles)

【结果】

无需纯化基因组DNA，可识别基因型。



【8】 相关 Protocol: RNA 样品合成 cDNA

本试剂可以用各种逆转录反应用试剂合成的cDNA作为模板。如使用Realtime PCR专用的逆转录反应用试剂，则可进行灵敏度更高的反应。

本公司ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Code: FSQ-101)、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix(Code : FSQ-201)、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Code : FSQ-301)是专为Realtime PCR设计的高效率cDNA合成试剂盒，与本产品组合使用，可获得可信度更高的结果。以下为使用ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit, Realtime PCR用cDNA合成法的介绍（详细请参考该试剂盒添附的产品使用说明书）。

●ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Code: FSQ-101)

(1) RNA的变性 (Option)

按使用量分取作为模板使用的RNA溶液，在65℃条件下进行5分钟温育后，在冰上急速冷却。

- 该步骤可省略，但通过该处理，可提高容易形成高级结构的RNA的逆转录效率。

- 进行该处理时，请不要添加5×RT Buffer、RT Enzyme Mix，否则会造成RNA的分解和酶活性的低下等。

(2) 反应液的配制

在冰上配制如下反应液。

Nuclease-free Water	X μl
5×RT Buffer	2 μl
RT Enzyme Mix	0.5 μl
Primer Mix	0.5 μl
RNA	0.5pg~1μg相当
Total volume	10 μl

(3) 逆转录反应

将反应液轻轻搅拌均匀后，在以下温度条件下进行温育。

37°C,	15分钟	(逆转录反应)
98°C,	5分钟	(酶失活反应)
4°C,	hold		

反应结束后，在4°C或-20°C条件下保存。进行Realtime PCR时，可作为模板直接或稀释后添加到反应液中。

【9】 常见问题

现象	原因	对策
用高浓度样品反应时线性混乱	由于SYBR® Green I与样品DNA的结合导致基线上飘	SYBR® Green I与全部双链DNA相结合，由于具有发光的特性，当样品中含高浓度的双链DNA时，会造成基线上飘，从而无法计算出正确的Ct值。请适当降低样品浓度再进行反应。
	样品溶液中的杂质抑制了反应	当样品纯度较低时，其所含的杂质会抑制PCR反应。此外，使用非Realtime PCR专用逆转录试剂盒合成的cDNA时，逆转录反应液中所含的物质也会抑制PCR反应。请降低样品浓度，或将样品纯化后再进行反应。建议使用Realtime PCR专用cDNA合成逆转录试剂盒。

现象	原因	对策
用低浓度样品反应时线性混乱	目标DNA的拷贝数过少	反应液中的目标DNA的拷贝数只有几倍到几十倍时，拷贝数散乱的概率变大，容易形成线性混乱。此时请适当提高样品浓度再进行反应。
	DNA被反应离心管所吸附	使用样品的DNA量较少或样品稀释后被长时间存放的情况下，会使得DNA被反应离心管吸附，从而造成实质性的模板量减少。请提高样品浓度再进行反应。另外，如果要对样品进行稀释，请稀释后立即进行反应。
	同时产生引物二聚体	对目标DNA进行扩增时，同时发生引物二聚体的扩增，从而无法检测出目的片段的扩增曲线。进行融解曲线分析，出现几个峰值时，请再次摸索反应条件，防止引物二聚体的再次发生。在end point assay中，在不会抑制反应的前提下，将模板量增加到最大，减少循环数，可避免出现该问题。
稀释系列样品的扩增曲线的间隔不均一	与非特异性反应的竞争	引物的特异性不够充分的情况下，会同时发生目标以外的扩增，从而无法检测出目的片段的扩增曲线。进行融解曲线分析，出现几个峰值时，请再次摸索反应条件，防止引物二聚体的再次发生。仍无法得到改善时，请尝试重新摸索引物序列。
	以质粒为模板	以环状质粒为模板使用时，容易产生荧光散乱。此时请用限制酶酶切，使用直链的质粒。
PCR效率低于80% (slope < -3.95)	反应条件不合适	根据目的片段的不同，有可能出现在标准的反应条件下无法得到充分的PCR效率的情况。请根据 [4]使用方法 (2) PCR循环条件的设定 ，重新摸索PCR反应条件。
	引物的T _m 值低于一般情况 (60°C以下)	使用T _m 值较低的引物时，会出现在标准的循环条件下无法充分退火的情况。请根据 [4]使用方法 (2) PCR循环条件的设定 ，重新摸索退火温度。
	引物质量不好	当引物质量不好时，会导致PCR效率大幅下降。可从引物原液重新稀释，或重新合成引物。
	计算PCR效率时，包含了偏离直线的C _t 值	如果计算PCR效率时，包含了偏离直线的C _t 值，会增大计算值的误差。应将偏离直线的C _t 值排除后再计算。
	引物量少	增加引物量，可改善扩增效率。

现象	原因	对策
PCR效率高于110% (slope > -3.1)	计算PCR效率时, 包含了偏离直线的Ct值	如果计算PCR效率时, 包含了偏离直线的Ct值, 会增大计算值的误差。应将偏离直线的Ct值排除后再计算。
	发生非特异性反应	由于发生了非特异性反应, 有时会出现PCR效率高于110%的情况。可进行融解曲线分析确认特异性。
重现性差	样品纯度不好	不纯的样品会抑制PCR反应, 从而导致实验的重现性差。可降低样品的浓度或对样品进行纯化后再反应。
	使用了稀释后长时间放置的样品	浓度较低的DNA溶液长时间存放时, 由于被反应容器吸附, 实际浓度会更低。请从原液重新稀释后再进行反应。另外, 通过梯度稀释的标准样品应避免稀释后再保存, 最好每次使用时直接从原液稀释。
	使用了纯化质粒DNA或PCR扩增产物作为模板	使用纯化质粒DNA溶液或PCR扩增产物作为模板时, 有时会使用稀释后的溶液。此时, 溶液中DNA浓度非常低, DNA很容易被容器吸附而减少, 这会造成低浓度区域的直线性及重现性差。在稀释时, 可以在稀释液中混合一些与反应无关的核酸(Yeast RNA等), 可改善低浓度区域的直线性。
	引物质量不好	即便是同一序列的引物, 在合成时也会发生质量上的差异。可在新合成时, 与原来使用的引物做一下比较实验, 以确认质量差异。

现象	原因	对策
no-template control (NTC) 可见扩增	产生了引物二聚体	融解曲线分析时，no-template control在目的片段的低温侧出现峰值，疑似有引物二聚体产生。引物二聚体根据引物序列或引物质量的不同而发生的程度有所差异。首先根据 [4] 使用方法 (2) PCR循环条件的设定 再次探讨PCR的反应条件，如果仍无法改善，则可进行引物的再设计或再合成。合成时，纯化级别请选择HPLC以上。
	发生交叉污染	进行融解曲线分析时，no-template control的峰值和目的片段大致在同一位置时，可能是扩增产物的带入所引起的。如果再次尝试仍然如此，则可能是由试剂类或灭菌水的交叉污染所引起的，此时请换新的试剂或灭菌水。
扩增曲线的荧光信号很弱，或扩增曲线呈锯齿状	50×ROX reference dye添加量过剩	使用Passive Reference的仪器，50X ROX reference dye添加量过剩的情况下，荧光值修正后，SYBR [®] Green I的荧光值会较低。根据 [4] 使用方法 (1) 反应液的配制 确认50X ROX reference dye的添加量。
	荧光测定时间太短	一部分仪器，PCR的延伸时间过短时，荧光测定不能充分完成。扩增曲线的锯齿状较明显时，将延伸时间设定得稍长些(45~60秒)可得到改善。
	反应液量太少	以少于仪器的标准条件的液量进行反应时，荧光测定值的误差会增大，此时应增加液量。
融解曲线分析时可看到几个峰值	发生了非特异性反应	引物的特异性不好的情况下，会同时发生非特异性扩增，无法检测出纯粹的目的片段的扩增曲线。此时应重新探讨反应条件，以避免非特异性反应的产生。仍无法得到改善时，请重新设计引物序列。
	产生了引物二聚体	目标DNA的扩增与引物二聚体的扩增同时发生。此时应重新探讨反应条件以避免引物二聚体的发生。仍无法得到改善时，可重新设计引物或提高纯化级别。

现象	原因	对策
在引物上添加了GC tail, 但无法确认到Tm值的差	扩增长度过长	扩增长度过长时, GC tail对Tm值的影响会减小。请将引物设计为扩增长度在100bp以下。另外, 通过求扩增产物的Tm值, 可推测Tm值的差。
	扩增产物的GC含量过高	扩增产物的GC含量过高时, 即便不添加GC tail, Tm值也会显著变高。因此, GC tail对Tm值的影响会减小。此时, 请在其他区域设计引物。
Multiplex检测时, 不知道Tm值	扩增长度过长	扩增产物的Tm值在扩增长度较短的范围内, 与扩增长度成比例, Tm值会上升, 但到了某一长度之后, Tm值会变得恒定。在计算时, 求扩增产物的Tm值, 请在产生差异的扩增长度的范围内重新设计引物。
	扩增产物的GC含量过高	扩增产物的GC含量过高时, 由于在短链目的片段中Tm值也会变高, Tm值的差不容易产生。在短链范围内计算, 请将引物设计为Tm值产生差异。Tm值不变时, 请尝试在其他区域设计引物。
Multiplex检测时, 峰值的平衡不好	两种目的片段的扩增长度差异过于显著	SYBR [®] Green I Assay中, 与扩增长度成比例, 荧光强度会增强。因此, 扩增长度显著不同时, 即便扩增量相同, 峰值的高度也不同。请将引物重新设计为目的片段长度差异较小。此外, 减少峰值较高的目的片段的扩增引物量, 也可改善结果。
	退火效率不同	由于两种引物的Tm值显著不同时, 退火效率也会有显著差异, 因此扩增量的平衡会变差。此时, 请先尝试减少峰值高的引物量。仍无法得到改善时, 请重新将引物设计为两种引物的Tm值相同。

【10】 相关产品

● 高效率 SYBR® Green I 检测体系用 Realtime PCR 试剂

品名	容量	Code No.
SYBR® Green I检测体系用Realtime PCR试剂 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	1ml×1 (40次份)	QPS-201T
	1.67ml×3 (200次份)	QPS-201

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

※容量为 50μl 反应体系时的反应次数。

● 各种荧光 Probe · 荧光引物检测体系用 Realtime PCR 试剂

品名	容量	Code No.
各种荧光Probe · 荧光引物检测体系用 Realtime PCR试剂 THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix	1ml×1 (40次份)	QPS-101T
	1.67ml×3 (200次份)	QPS-101

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

※容量为 50μl 反应体系时的反应次数。

● cDNA 合成试剂

品名	容量	Code No.
Realtime PCR用cDNA合成试剂盒 ReverTra Ace® qPCR RT Kit	200次份	FSQ-101
Realtime PCR用cDNA合成试剂盒 完全预混型 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix	200次份	FSQ-201
Realtime PCR用cDNA合成试剂盒 完全预混型 (添附去除基因组DNA试剂) ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	200次份	FSQ-301

[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: