

TaKaRa Code: DRR489

---

**SYBR<sup>®</sup> Premix Reagent  
Trial Pack**  
(50  $\mu$ l 反应 $\times$ 各 40 次量)

---

说明书

**TaKaRa**

宝生物工程(大连)有限公司

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒原理	1
● 操作注意	2
● 操作方法	2
◆ 应用 Thermal Cycler Dice Real Time System 扩增仪的操作方法	2
◆ 应用 ABI PRISM 7000 及 Applied Biosystems 7500 Real Time System 的操作方法	3
◆ 应用 Applied Biosystems 7500 Fast Real Time System 的操作方法	5
◆ 应用 LightCycler Real Time PCR 扩增仪的操作方法	6
● 各试剂选择方法	7
● 进行 RT-PCR 反应时的实验方法	8
● Real Time PCR 反应实验例	9
● 引物设计说明	11
● 引物设计服务	11

**◆ 特别提示:**

本制品请于 4℃ 避光保存, 避免-20℃ 保存制品!

## ● 制品说明

TaKaRa公司目前采用SYBR® Green I嵌合荧光法进行Real Time PCR的专用试剂有三种。这三种试剂名称如下，它们各自具有不同的反应特异性及扩增效率。

- SYBR® *Premix Ex Taq*<sup>TM</sup> (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR041)
- SYBR® *Premix Ex Taq*<sup>TM</sup> II (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR081)
- SYBR® *Premix DimerEraser*<sup>TM</sup> (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR091)

本制品是这三种试剂的组合包装，可以根据不同实验目的选择使用。每种产品的特性请参照本说明书第7~8页的“各试剂选择方法”。本制品适用的仪器如下：

- Thermal Cycler Dice® Real Time System (TaKaRa Code: TP800等)
- ABI PRISM® 7000、7500及7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems公司)
- LightCycler® (Roche Diagnostics公司) 等。

注：Smart Cycler® System (Cepheid) 不推荐使用DRR081。

## ● 制品内容 (50 µl 反应×各 40 次)

SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> <sup>TM</sup> (Perfect Real Time) (2×conc.) *1	1 ml ×1 支
SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> <sup>TM</sup> II (Perfect Real Time) (2×conc.) *1	1 ml ×1 支
SYBR® <i>Premix DimerEraser</i> <sup>TM</sup> (Perfect Real Time) (2×conc.) *1	1 ml ×1 支
ROX Reference Dye (50×Conc.) *2	200 µl ×1 支
ROX Reference Dye II (50×Conc.) *2	200 µl ×1 支

\*1 内含 *TaKaRa Ex Taq* HS, dNTP Mixture, Mg<sup>2+</sup>, SYBR® Green I等。

\*2 只使用在 ABI、Stratagene 等公司的 Real Time PCR 扩增仪上，用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。使用 ABI PRISM 7000/7700/7900HT 和 7300 Real-Time PCR System 使用 ROX Reference Dye, 7500 Real-Time PCR System 和 7500 Fast Real-Time PCR System 使用 ROX Reference Dye II, Stratagene 公司的 Mx3000P 也适用 ROX Reference Dye II。Thermal Cycler Dice Real Time System、LightCycler、Smart Cycler System 等 Real Time PCR 扩增仪时不必使用。

## ● 保 存

4℃避光保存，避免冻结制品。-20℃反复冻融制品性能可能下降，请避免-20℃冻结制品。

## ● 试剂盒原理

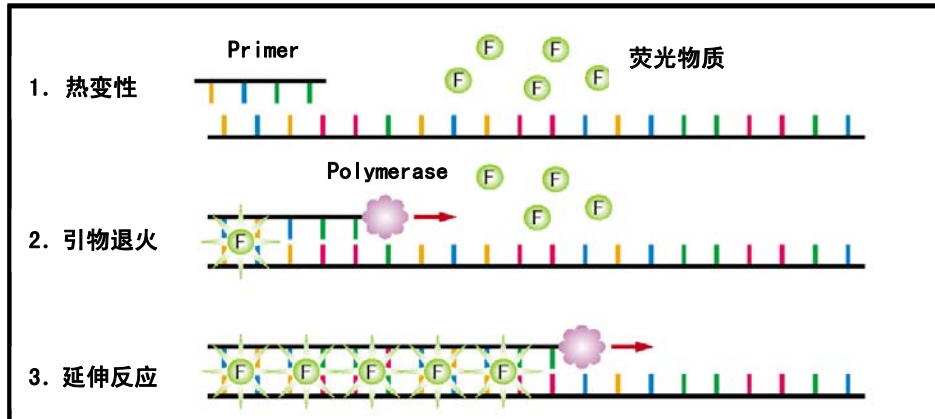
本制品使用了改良后的 *TaKaRa Ex Taq* HS 进行 PCR 扩增，通过检测反应液中 SYBR Green I 的荧光强度，达到监控 PCR 产物扩增量的目的。

1. PCR 法是以极微量的 DNA 为模板，对目的基因进行特异性扩增的技术。由模板热变性、引物退火、DNA 聚合酶延伸反应构成一个循环，重复这个循环，可在几个小时内把目的 DNA 扩增 100 万倍以上。本制品中的 DNA 聚合酶采用比 *Taq* 酶扩增效率更高的 *TaKaRa Ex Taq* HS 酶，可以在更短的时间内进行高灵敏度的检出，并有效防止在热循环前由引物错配及引物二聚体产生的非特异性扩增。

2. 嵌合荧光检测法。

SYBR® Green I 与双链 DNA 结合后发出荧光，所以可以通过检测反应体系中的 SYBR® Green I 荧光强度，达到检测 PCR 产物扩增量的目的。

具体原理见下图。通过PCR反应生成双链DNA，SYBR® Green I与双链DNA结合发出荧光，通过检测PCR反应液中的荧光信号强度，可以对目的基因进行准确定量，同时还可以测定扩增的目的DNA片段的融解温度。



### ●操作注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前请一定认真阅读。

1. 使用时请上下颠倒轻轻均匀混合，避免起泡，并轻轻离心后使用。如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。但请不要使用振荡器混匀。
2. 请于冰上配制反应试剂。
3. 本制品中含有荧光染料SYBR® Green I，保存制品或配制PCR反应液时应避免强光照射。
4. 反应液的配制、分装请一定使用新的（无污染的）枪头、Microtube等，尽量避免污染。

### ●操作方法

SYBR® *Premix Ex Taq*<sup>TM</sup> (Perfect Real Time) 及SYBR® *Premix Ex Taq*<sup>TM</sup> II (Perfect Real Time) 推荐使用Shuttle PCR (2 Step PCR) 法，SYBR® *Premix DimerEraser*<sup>TM</sup> (Perfect Real Time) 推荐使用3 Step PCR法。

#### ◆应用Thermal Cycler Dice® Real Time System扩增仪的操作方法

请按照Thermal Cycler Dice® Real Time System (TaKaRa Code: TP800) 的使用说明书要求进行实验操作。

- ① 按下列组份配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	使用量	终浓度
各种SYBR® Premix (2×)	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	x μl	y μM*1
PCR Reverse Primer (10 μM)	x μl	y μM*1
DNA 模板	2 μl	<100 ng*2
dH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	Up to 25 μl	
Total	25 μl*3	

- \*1 引物使用量根据试剂的不同而不同，反应性能较差时，可以在0.1~1.0 μM 范围内调整引物浓度。
- \*2 DNA 模板的添加量通常在100 ng 以下。因不同种类的DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的DNA 模板添加量。  
如果欲使用本制品进行2 Step RT-PCR 反应的第二步PCR 扩增反应，第一步的RT 反应液作为DNA 模板时的添加量不要超过PCR 反应液总体积的10%。
- \*3 建议反应液体积为25 μl。

使用各种SYBR® Premix (2×) 时的Primer使用量如下表。

试剂	Primer 使用量(x)	Primer 终浓度(y)
SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> ™	0.5 μl	0.2 μM
SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> ™ II	1.0 μl	0.4 μM
SYBR® <i>Premix DimerEraser</i> ™	0.75 μl	0.3 μM

② 进行 Real Time PCR 反应。

PCR 反应条件根据 PCR 试剂的不同而不同，首先请按以下各种试剂的标准条件进行反应：

SYBR® *Premix Ex Taq*™及SYBR® *Premix Ex Taq*™ II:

预变性 (Hold)	→	2 Step PCR Cycles: 40	→	融解曲线分析 (Dissociation)
95°C 30 sec		95°C 5 sec		
		60°C 30 sec		

SYBR® *Premix DimerEraser*™:

预变性 (Hold)	→	3 Step PCR Cycles: 40	→	融解曲线分析 (Dissociation)
95°C 30 sec		95°C 5 sec		
		55°C 30 sec		
		72°C 30 sec		

◆特别提示:

本制品中使用的 *TaKaRa Ex Taq* HS 是利用抗 Taq 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶，与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比，不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量精度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、30 秒。

③ 实验结果分析。

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行标准曲线制作等。

◆应用ABI PRISM® 7000 及Applied Biosystems 7500 Real Time System的操作方法

请按照 Applied Biosystems 公司的仪器使用说明书要求进行实验操作。

① 按下列组份配制 PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

试剂	使用量	终浓度
各种SYBR® Premix (2×)	25 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	x μl	y μM *1
PCR Reverse Primer (10 μM)	x μl	y μM *1
ROX Reference Dye or Dye II (50×)	1 μl	1×*2
DNA 模板	4.0 μl	<200 ng*3
dH2O (灭菌蒸馏水)	Up to 50 μl	
Total	50 μl	*4

- \*1 引物用量根据试剂的不同而不同，反应性能较差时，可以在 0.1~1.0  $\mu\text{M}$  范围内调整引物浓度。
- \*2 ABI PRISM® 7000 使用 ROX Reference Dye (50 $\times$ )，而 7500 Real-Time PCR System 使用 ROX Reference Dye II (50 $\times$ )。
- \*3 50  $\mu\text{l}$  反应体系的 DNA 模板的添加量通常在 200 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的 DNA 模板添加量。  
如果欲使用本制品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。
- \*4 建议反应液体积为 50  $\mu\text{l}$ 。

使用各种 SYBR® Premix (2 $\times$ ) 时的 Primer 使用量如下表。

试剂	Primer 使用量(x)	Primer 终浓度(y)
SYBR® Premix Ex Taq™	1.0 $\mu\text{l}$	0.2 $\mu\text{M}$
SYBR® Premix Ex Taq™ II	2.0 $\mu\text{l}$	0.4 $\mu\text{M}$
SYBR® Premix DimerEraser™	1.5 $\mu\text{l}$	0.3 $\mu\text{M}$

## ② 进行 Real Time PCR 反应。

PCR 反应条件根据 PCR 试剂的不同而不同，首先请按以下各种试剂的标准条件进行反应：

SYBR® Premix Ex Taq™ 及 SYBR® Premix Ex Taq™ II:

预变性 (Hold) $\longrightarrow$ 95°C 30 sec	2 Step PCR Cycles: 40 $\longrightarrow$ 95°C 5 sec 60°C 31 or 34 sec*	融解曲线分析 (Melt Curve Stage)
--	--	------------------------------

SYBR® Premix DimerEraser™:

预变性 (Hold) $\longrightarrow$ 95°C 30 sec	3 Step PCR Cycles: 40 $\longrightarrow$ 95°C 5 sec 55°C 30 sec 72°C 31 or 34 sec*	融解曲线分析 (Melt Curve Stage)
--	---	------------------------------

\*7000 设定 31 sec、7500 设定 34 sec。

### ◆特别提示:

本制品中使用的 *TaKaRa Ex Taq* HS 是利用抗 *Taq* 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶，与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比，不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活化反应。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量精度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、30 秒。

## ③ 实验结果分析。

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。

## ◆应用 Applied Biosystems 7500 Fast Real Time System 的操作方法

请按照 Applied Biosystems 公司的仪器使用说明书要求进行实验操作。

### ① 按下列组份配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	使用量	终浓度
各种SYBR® Premix (2×)	10 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	x μl	y μM *1
PCR Reverse Primer (10 μM)	x μl	y μM *1
ROX Reference Dye II (50×)	0.4 μl	
DNA 模板	2 μl	<100 ng*2
dH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	Up to 20 μl	
Total	20 μl	*3

\*1 引物使用量根据试剂的不同而不同，反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μM 范围内调整引物浓度。

\*2 DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的 DNA 模板添加量。

如果欲使用本制品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

\*3 建议反应液体积为 20 μl。

使用各种SYBR® Premix (2×) 时的Primer使用量如下表。

试剂	Primer 使用量(x)	Primer 终浓度(y)
SYBR® Premix Ex Taq™	0.4 μl	0.2 μM
SYBR® Premix Ex Taq™ II	0.8 μl	0.4 μM
SYBR® Premix DimerEraser™	0.6 μl	0.3 μM

### ② 进行 Real Time PCR 反应。

PCR 反应条件根据 PCR 试剂的不同而不同，首先请按以下各种试剂的标准条件进行反应：

SYBR® Premix Ex Taq™ 及 SYBR® Premix Ex Taq™ II:

预变性 (Hold) →	2 Step PCR Cycles: 40	融解曲线分析 (Melt Curve Stage)
95°C 30 sec	95°C 3 sec 60°C 30 sec	

SYBR® Premix DimerEraser™:

预变性 (Hold) →	3 Step PCR Cycles: 40	融解曲线分析 (Melt Curve Stage)
95°C 30 sec	95°C 3 sec 55°C 30 sec 72°C 30 sec	

反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、30 秒。

### ③ 实验结果分析。

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。

## ◆应用 LightCycler Real Time PCR 扩增仪的操作方法

请按照LightCycler® (Roche Diagnostics公司) 的使用说明书要求进行实验操作。

### ① 按下列组份配制 PCR 反应液 (反应液配制请在冰上进行)。

试剂	使用量	终浓度
各种SYBR® Premix (2×)	10 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	x μl	y μM *1
PCR Reverse Primer (10 μM)	x μl	y μM *1
DNA 模板	2 μl	<100 ng*2
dH2O (灭菌蒸馏水)	Up to 20 μl	
Total	20 μl	*3

\*1 引物使用量根据试剂的不同而不同, 反应性能较差时, 可以在 0.1~1.0 μM 范围内调整引物浓度。

\*2 DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同, 必要时可进行梯度稀释, 确定最佳的 DNA 模板添加量。

如果欲使用本制品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应, 第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

\*3 建议反应液体积为 20 μl。

使用各种SYBR® Premix (2×) 时的Primer使用量如下表。

试剂	Primer 使用量(x)	Primer 终浓度(y)
SYBR® Premix Ex Taq™	0.4 μl	0.2 μM
SYBR® Premix Ex Taq™ II	0.8 μl	0.4 μM
SYBR® Premix DimerEraser™	0.6 μl	0.3 μM

### ② 进行 Real Time PCR 反应。

PCR 反应条件根据 PCR 试剂的不同而不同, 首先请按以下各种试剂的标准条件进行反应:

SYBR® Premix Ex Taq™ 及 SYBR® Premix Ex Taq™ II:

预变性 (Hold) 95°C 30 sec → 2 Step PCR Cycles: 40 95°C 5 sec 60°C 20 sec → 融解曲线分析 (Melt Curve Stage)

SYBR® Premix DimerEraser™:

预变性 (Hold) 95°C 30 sec → 3 Step PCR Cycles: 40 95°C 5 sec 55°C 30 sec 72°C 30 sec → 融解曲线分析 (Melt Curve Stage)

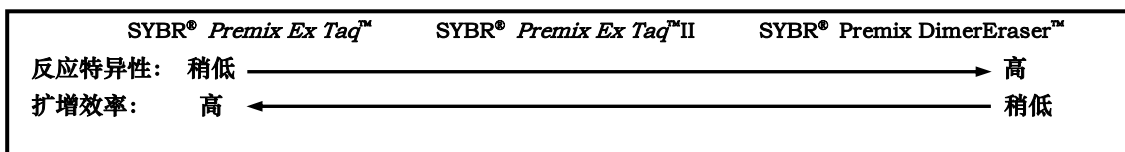
反应前进行模板的预变性, 通常设定为 95°C、30 秒。

### ③ 实验结果分析。

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线, 进行标准曲线制作等。

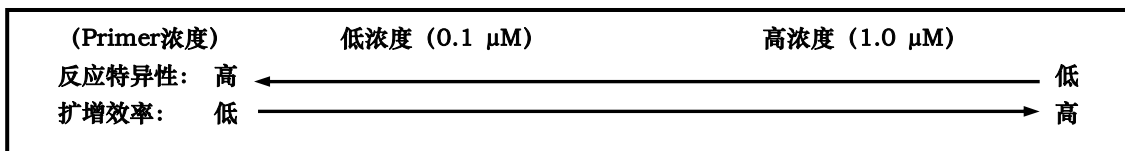
●各试剂选择方法

1. 选择试剂时, 请从反应特异性与扩增效率这两方面进行综合考虑。要求能同时满足这两个条件的反应体系, 并可以在较大浓度范围内进行很好的定量。
2. 当试剂间反应性能差异不大时, 使用可以进行 2 Step PCR的SYBR® *Premix Ex Taq*™和SYBR® *Premix Ex Taq*™ II所需时间会更短。
3. 反应特异性高的实验体系应具备以下条件:
  - No Template Control 时不产生引物二聚体等非特异性扩增。
  - 不产生目的片段以外的扩增。
4. 扩增效率高的实验体系应具备以下条件:
  - 扩增产物起峰更早 (Ct值小)。
  - PCR扩增效率高 (接近理论值100%)。
5. 各种试剂与反应性能间的关系如下:  
 各种SYBR® *Premix*试剂间的反应特异性与扩增效率关系: SYBR® *Premix DimerEraser*™适用于高特异性实验; SYBR® *Premix Ex Taq*™适用于高扩增效率的实验。可以图示如下:



6. Primer 浓度与反应性能间的关系如下:

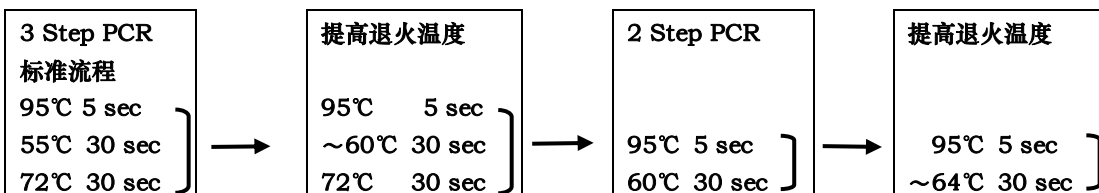
降低Primer浓度有助于提高特异性; 提高Primer浓度有助于提高扩增效率。可以图示如下:



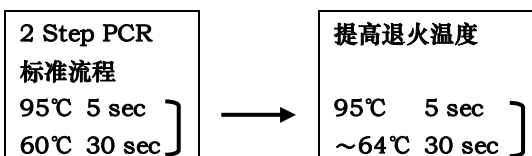
7. PCR 条件与反应性能间的关系如下:

① 要提高反应特异性, 可以提高退火温度或变为2 Step PCR反应。

■使用SYBR® *Premix DimerEraser*™按照以下流程改进3 Step PCR反应条件, 可以提高反应特异性。

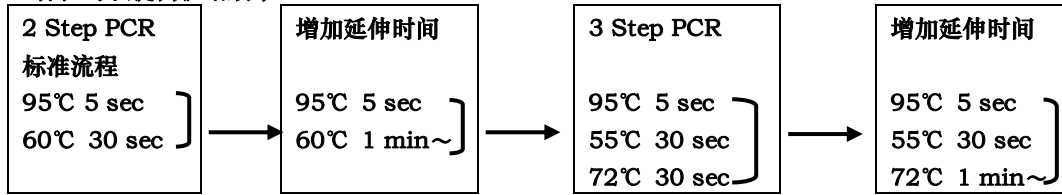


■使用SYBR® *Premix Ex Taq*™或SYBR® *Premix Ex Taq*™ II按照以下流程改进2 Step PCR反应条件, 提高退火温度, 可以改善反应的特异性。

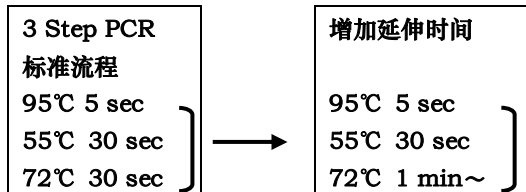


② 要提高扩增效率，可以增加延伸时间或变为 3 Step PCR 反应。

■使用SYBR® *Premix Ex Taq™*及SYBR® *Premix Ex Taq™ II*按照以下流程改进2 Step PCR反应条件，可以提高扩增效率。



■使用SYBR® *Premix DimerEraser™*按照以下流程改进 3 Step PCR反应条件，增加延伸时间，可以改善扩增效率。



### ●进行 RT-PCR 反应时的实验方法

反转录反应使用PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR037A)，与各种SYBR® *Premix*试剂组合使用，都能得到良好的实验结果。

1. 按下列组份配制 RT 反应液（反应液请在冰上配制）。

使用PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Code: DRR037A) 试剂。

试剂	使用量	终浓度
5×PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 µl	1×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 µl	
Oligo dT Primer (50 µM) *1	0.5 µl	25 pmol
Random 6 mers (100 µM) *1	0.5 µl	50 pmol
Total RNA		
RNase Free dH2O		
Total	10 µl*2	

\*1 Random 6 mers 和 Oligo dT Primer 同时使用，可有效地将全长 mRNA 反转录成 cDNA。

使用单引物进行反转录时，使用量分别如下：

Random 6 mers (100 µM) 0.5 µl (50 pmol)

Oligo dT Primer (50 µM) 0.5 µl (25 pmol)

Specific Primer (2 µM) 0.5 µl (1 pmol)

\*2 反应体积可按需求相应放大，10 µl 的反应体系可最大使用 500 ng 的 Total RNA。

2. 反转录反应条件如下：

37°C 15 min (反转录反应) \*3

85°C 5 sec (反转录酶的失活反应)

4°C

\*3: 使用 Gene Specific Primer 时，反转录反应条件请使用 42°C 15 min。如果 Real Time PCR 反应有非特异性产物生成时，反转录温度提高至 50°C 对提高 PCR 反应特异性会有所改善。

3. 取上述 2.5~1 µl\*RT 反应液（或 RT 反应的稀释液），进行 25 µl 体系的 Real Time PCR 反应。

\* RT 反应液的加入量不要超过 PCR 反应体积的 1/10 (V/V) 量。

## ● Real Time PCR 反应实验例

使用本产品，以 $\lambda$  DNA为模板，进行Real Time PCR扩增，比较3种SYBR® Premix试剂的反应性能。本次PCR扩增产物的大小要比推荐范围（80-150 bp）更长，有300 bp，扩增效率会稍有降低。

### 1. 实验方法。

实验试剂：本产品的三种SYBR® Premix试剂

PCR条件：各试剂的实验推荐条件

PCR模板： $\lambda$  DNA 1 fg、10 fg、100 fg、1 pg、10 pg、100 pg（各一个反应）；  
No Template Control（2个反应）

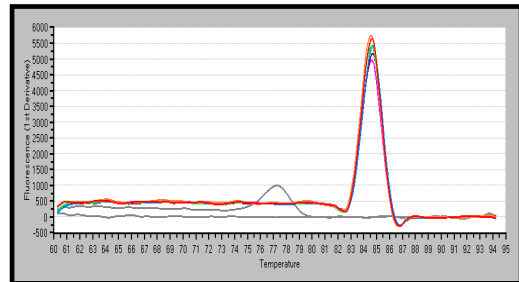
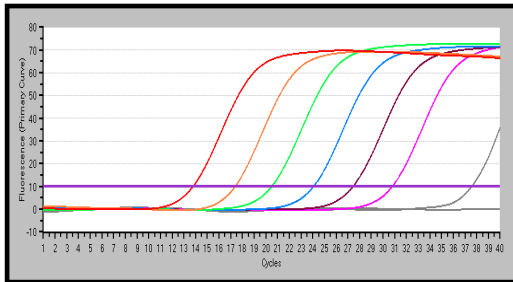
扩增产物：300 bp

PCR仪器：Thermal Cycler Dice® Real Time System

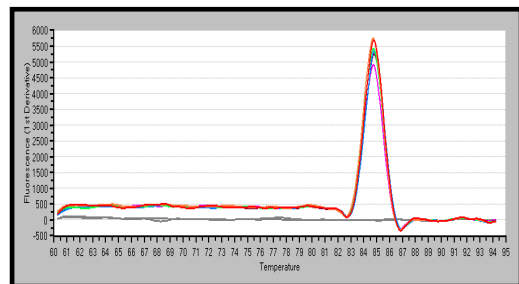
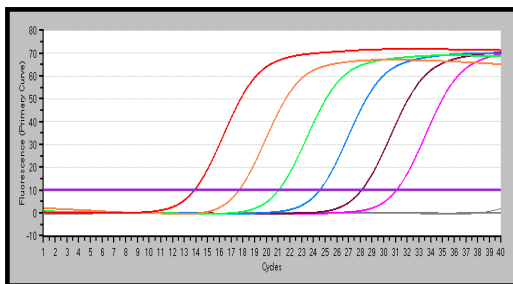
### 2. 实验结果。

#### ① 扩增曲线及溶解曲线。

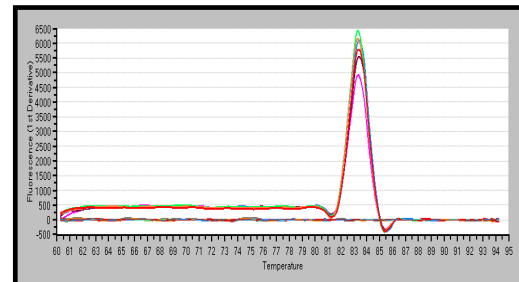
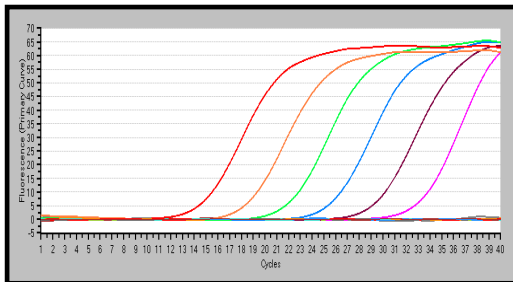
##### SYBR® Premix Ex Taq™



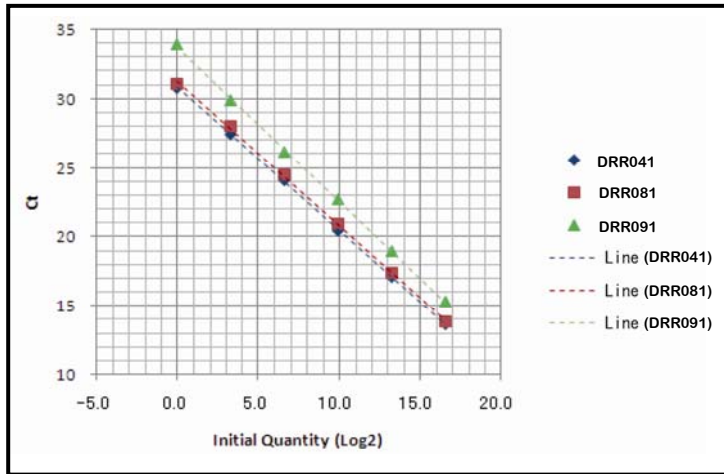
##### SYBR® Premix Ex Taq™ II



##### SYBR® Premix DimerEraser™



② 标准曲线及 PCR 扩增效率。



<PCR扩增效率>

SYBR® *Premix Ex Taq*™ 95%

SYBR® *Premix Ex Taq*™ II 94%

SYBR® *Premix DimerEraser*™ 86%

③ 实验结果分析。

◆ 关于反应特异性。

在SYBR® *Premix Ex Taq*™的2个No Template Control扩增反应中，有1管有引物二聚体产生的非特异性扩增，SYBR® *Premix Ex Taq*™ II与SYBR® *Premix DimerEraser*™的No Template Control扩增反应没有产生非特异性扩增。

◆ 关于扩增效率。

根据标准曲线得到扩增效率，结果显示，SYBR® *Premix Ex Taq*™及SYBR® *Premix Ex Taq*™ II的扩增效率高于SYBR® *Premix DimerEraser*™。

◆ 实验体系适用的试剂。

从反应特异性与扩增效率进行综合判断，SYBR® *Premix Ex Taq*™ II更适用于本扩增反应。

## ●引物设计说明

进行 Real Time PCR 反应时, 设计反应性能良好的 PCR 引物非常重要。根据以下原则, 可以设计 PCR 扩增效率高, 反应特异性强的良好引物。

◆ PCR 扩增产物长度: 80~150 bp 最为合适 (可以延长至 300 bp)。

◆ 设计引物要求如下:

引物长度	17 ~ 25 mers
GC 含量	40 ~ 60% ( 45 ~ 55%最佳 )
Tm 值	Forward Primer 和 Reverse Primer 的 Tm 值 不能相差太大。 Tm 值的计算使用专用软件。 OLIGO *1: 63 ~ 68℃ Primer3 *2: 60 ~ 65℃
引物序列	A、G、C、T 整体分布尽量均匀。 不要有部分的 GC rich 或 AT rich ( 特别是 3' 端 )。 避开 T/C ( Polypyrimidine ) 或 A/G ( Polypurine ) 的连续结构。
3' 末端序列	避免 GC rich 或 AT rich。 3' 端碱基最好为 G 或 C。 尽量避免 3' 末端碱基为 T。
互补序列	避开引物内部或两条引物之间有 3 个碱基以上的互补序列。二条引物间的 3' 末端避开有 2 个碱基以上的互补序列。
特异性	使用 BLAST *3 检索确认引物的特异性。

\*1 OLIGO: Primer Analysis Software。

\*2 Primer3: ( <http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/software/> )

\*3 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

## ●引物设计服务: 本公司提供用于基因表达定量分析的引物设计及合成服务

本公司以美国 NCBI Data Base 上登录的 Human、Mouse、Rat、Cow、Dog、Chicken 的 RefSeq 为对象, 已经设计完成了各基因用于定量表达分析的 Real Time RT-PCR 用高特异性 Primer Set, 此 Primer Set 最适于本制品使用, 可省略 PCR 反应条件优化实验。具体情况如下:

可提供 1~3 对合适的引物, 由客户自己选择。

1. 从 3' 端开始的 1,500 Base 内的引物候补序列。
2. 从 5' 端开始的 1,500 Base 内的引物候补序列。
3. 针对 Target 基因全长的引物候补序列。

注) 本公司只对在本公司合成的引物/探针提供免费设计服务, 恕不受理不在本公司合成的引物/探针的设计委托!

# MEMO



**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686  
8008909508, 4006518769

**宝生物工程（大连）有限公司**

**TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.**

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: [service@takara.com.cn](mailto:service@takara.com.cn)

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.04

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂