

2×SYBR Green qPCR 试剂 (预混 ROX2 型)

产品使用说明 (Version 3.0)

产品名称: 2×SYBR Green qPCR 试剂 (预混 ROX2 型)

英文名称: 2×SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2)

货号规格: UR32081 (500 Rxns×20μL)

运输存储: 冰袋运输, -20℃避光存储。

产品描述:

本试剂盒采用具有超强扩增能力和抗干扰能力的热启动 DNA 聚合酶, 结合其高度优化的缓冲液体系和染料系统, 使之具备更强的扩增效率、抗干扰能力, 更高的灵敏度和特异性。在相同的情况下具有起峰更早、得到的荧光信号更强、Ct 值更小及熔解曲线特异性更高等特点。此外, 为了进一步简化操作, 本试剂盒的 2×SYBR Green qPCR Master Mix 预混了 ROX2 染料 (low ROX), 从而只需要将模板 cDNA、引物以及 ddH₂O 添加进去, 即可进行 qPCR 反应。

产品组分:

组分	规格
2×SYBR Green qPCR Master Mix(ROX2)*	5 mL

*包含热启动 DNA 聚合酶, dNTPs, Mg²⁺, buffer, 和 SYBR Green I 染料, 且预混了低浓度 ROX(ROX2)用于校正不同孔之间的荧光信号误差。

适用的仪器型号:

ABI 7500, 7500 Fast, Quant-Studio 3, 5, 6, 7, 12K Flex, Dx, ViiA™7; **Stratagene** MX4000™, MX3000P™, MX3005P™.

Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; **Roche** LightCycler™ 96, Roche LightCycler™ 480; **Eppendorf** Mastercycler® ep realplex, realplex 2s; **Illumina** Eco qPCR; **Qiagen/Corbett** Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; **Thermo Scientific** PikoReal Cyclers; **Analytikjena** qTOWER 3G; **Cepheid** SmartCycler®.

(如果仪器不在下表中, 请选用 UR32071: 2×SYBR Green qPCR 试剂 (预混 ROX1 型))

产品使用:

- 1、使用前, 将2×SYBR Green qPCR Master Mix(ROX2)试剂从-20℃冰箱中取出, 室温放置5 ~ 10分钟或用手紧握试剂管使之充分融化, 上下颠倒5 ~ 10次充分混匀 (**非常重要**), 使用离心机短暂离心至管底, 放在冰上备用。
- 2、逆转录反应得到的cDNA建议稀释并充分混匀后再作为模板使用, 这样可以提高实验的重复性。通常建议稀释5 ~ 10倍后再使用 (具

Umibio Science and Technology Group

上海公司地址: 上海市浦东新区青黛路 800 号 绍兴公司地址: 浙江省绍兴市越城区天姥路 1 号
电话: 4006-166-973 021-60521508 QQ: 3423485078; 网址: www.umibio.cn

体的稀释倍数根据基因表达丰度来确定)。在 20 μL 的 qPCR 反应体系中: 如果模板 cDNA 稀释 5 倍, 建议使用 2 μL 的 cDNA (1 ~ 4 μL); 如果模板 cDNA 稀释 10 倍, 建议使用 4 μL 的 cDNA (2 ~ 8 μL); 如果模板 cDNA 稀释 20 倍, 建议使用 9.2 μL 的 cDNA; 如果模板

cDNA 不稀释, 建议使用 0.4 μL 的 cDNA (0.2 ~ 0.8 μL)。

假定模板 cDNA 在使用前已经用灭过菌的 ddH₂O 稀释了 5 倍 (20 μL cDNA 加 80 μL ddH₂O 稀释至 100 μL), 按照如下表格进行 qPCR 反应体系的配制:

成分	10 μL 体系	20 μL 体系
2 $\times$ SYBR Green qPCR Master Mix(ROX2)	5 μL	10 μL
正向引物 (10 μM)	0.2 μL	0.4 μL
反向引物 (10 μM)	0.2 μL	0.4 μL
cDNA	1 μL (0.5 ~ 2 μL)	2 μL (1 ~ 4 μL)
ddH ₂ O (灭过菌)	补足到 10 μL	补足到 20 μL

3、qPCR 加样体系的配制: 为了使加样误差降低到最低, 一般建议将 cDNA 和 ddH₂O 配制成预混液, 2 $\times$ SYBR Green qPCR Master Mix 和引物对配制成预混液, 分别混匀后再依次加入到每个反应孔中 (例如, 对于 20 μL 的 qPCR 反应体系: 每个反应孔中, cDNA 和 ddH₂O 的预混液加 9.2 μL , 2 $\times$ SYBR Green

qPCR Master Mix 和引物对的预混液加 10.8 μL); 或者根据个人熟练掌握的加样方式进行加样。

4、加样完成后, 盖上封板膜并封紧, 然后用离心机 1000 rpm 离心 1 分钟, 将液体离心至 qPCR 孔板底部。

5、qPCR 反应程序如下:

Step	1	2	
	热启动酶活化*1	PCR 反应(循环数 40 cycles)	
		解链	退火&延伸 (采集荧光信号) *2
温度	95 $^{\circ}\text{C}$	95 $^{\circ}\text{C}$	60 $^{\circ}\text{C}$
时间	5 min	10 sec	30 sec

上述反应程序设置好后, 按照仪器默认的程序添加熔解曲线。

注意: *1: 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 分钟的目的是活化热启动酶, 该步骤为必须步骤, 因此不能省略;

*2: 在退火&延伸这一步骤需要进行荧

光信号的采集。

下方表格提供了一种代表性的熔解曲线程序供参考:

Umibio Science and Technology Group

上海公司地址: 上海市浦东新区青黛路 800 号 绍兴公司地址: 浙江省绍兴市越城区天姥路 1 号
电 话: 4006-166-973 021-60521508 QQ: 3423485078; 网 址: www.umibio.cn

Step	1	2	3
加热或降温速度	100%	100%	1%
温度	95℃	60℃	95℃
时间	15 sec	1 min	30 sec
采集数据	-	-	升温阶段采集荧光信号

关于 qPCR 反应是否良好的判断：

- 1、如果扩增曲线呈典型的S型曲线，荧光背景信号阶段、荧光信号指数扩增阶段及平台期均完整可见，熔解曲线单峰，内参Ct值在合理范围内（通常可在13 ~ 22之间，典型的内参Ct值在15 ~ 20之间），则可认为该反应正常；
- 2、同一个模板和引物的重复孔数据Ct值相差0.5以内；
- 3、同时满足以上两个条件的可以认为数据可用。

qPCR 引物的设计：

- 1、通过Google Scholar查询文献当中的引物，通常中等及以上水平期刊中的qPCR引物绝大多数可以直接使用；
- 2、NCBI数据库的Blast数据库中的Primer Blast提供了针对序列或者Gene ID的qPCR引物设计方案，每个基因建议设计2对引物进行合成、验证；
- 3、Primer Bank数据库中有部分已经验证过的引物可作为参考或者直接合成使用。

常见的注意事项、操作要点及优化方法：

- 1、实验开始前首先验证引物是否适用，标准与上述标准类似，主要观察扩增曲线与熔解曲线；
- 2、引物验证好用后应分装几份并放在-20℃保存，以防止污染或降解；
- 3、RNA及cDNA的质量均对qPCR的结果具有很大的影响，因此应尽量保证RNA不降解。RNA提取后应尽快进行逆转录，且避免反复冻融。如果预计使用量较大，则可以一次多逆转录几管cDNA。如果不立即使用cDNA，则建议保存在-80℃冰箱。