

Version 5

Code No. AG11702

SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 II

SYBR Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit II

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

➤ 产品概述

本产品是采用 SYBR Green 嵌合荧光法进行 qPCR 的专用试剂，是一种 2X Premix 试剂，反应液配制简便。本产品中 SYBR Green I 浓度、PCR 反应体系都进行了优化，使其特异性强、PCR 扩增效率高，可以进行高灵敏度的 Real Time PCR 反应，可以在宽广的定量区域内得到良好的工作曲线，从而对靶基因进行准确定量检测。

➤ 产品组成

组分名称	AG11702 (500 rxns / 20 μ l)
2X SYBR Green <i>Pro Taq</i> HS Premix II	1 ml x 5 pcs

➤ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

(避光保存，长期保存放置在-20℃，产品融化后可于 4℃保存 1 个月。)

运输温度：干冰运输或-20℃冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品是一种 2X 预混液，预先混有 SYBR Green I，反应液配制十分简单，仅需加入引物、模板及 RNase free water 即可进行 qPCR 反应。
2. 本产品对 SYBR Green I 浓度及 PCR 反应体系进行了优化，具有扩增效率高、扩增特异性强等特点。

➤ 实验原理

1. PCR 扩增原理

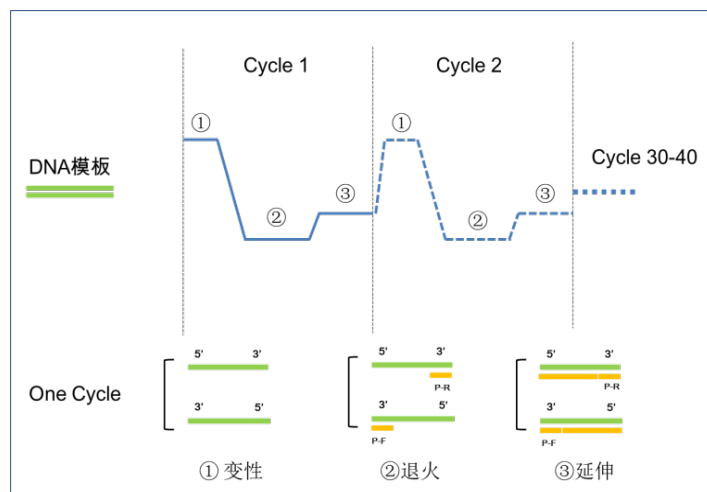
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

扩增详情如下图：一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30 ~ 40 次。

步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

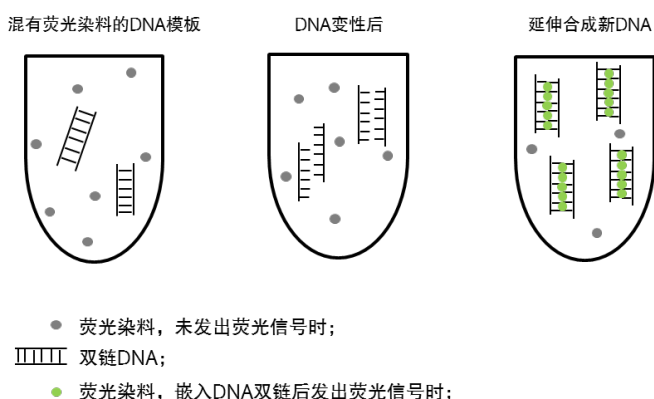
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下延伸，与单链 DNA 形成互补链。



2. qPCR 反应原理

SYBR Green I 荧光染料嵌合法利用 SYBR Green I 与双链 DNA 结合后发出荧光的原理，首先将荧光染料 SYBR 加入 PCR 反应液中，在 PCR 扩增的延伸过程中，SYBR Green I 可以嵌合到双链 DNA 双螺旋小沟区域并发出荧光，此时通过检测反应进程中的荧光信号值，达到对靶标基因进行定性/定量分析的目的。



➤ 使用注意事项

- 请仔细阅读所用定量 PCR 仪器设备操作手册，根据仪器操作手册进行操作。
- 本产品中未配有 ROX Reference Dye，如果反应中需要添加 ROX Reference Dye 用以校正孔间荧光信号值误差，可选择如下产品配合使用：（请根据仪器设备说明书要求确定是否需要添加 ROX Reference Dye）

ROX Reference Dye (20 μ M) (AG11703)

ROX Reference Dye (4 μ M) (AG11710)

注：上述 ROX Reference Dye 产品建议 50X 稀释使用（例如，50 μ l 反应体系中添加 1 μ l ROX Reference Dye），如果实验结果不理想，可调整 ROX Reference Dye 添加量。

- 产品避免反复冻融，防止酶活降低；使用前可上下颠倒混匀，请勿涡旋振荡混匀，防止酶活降低，同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。
- 产品中含有 SYBR Green I，因此溶液操作过程中要注意避免强光照射。
- 产品-20℃存放可能会产生淡黄色或白色沉淀，使用前可于冰上溶解或手握放置，颠倒混匀至沉淀全部消失。请勿使用涡旋振荡。

➤ 实验前准备

1) 试剂 & 耗材：

Primer、DNA 模板、RNase free water 、定量 PCR tube、带滤芯枪头。

2) 仪器：

	仪器
无需添加	(Bio-Rad) IQ5, CFX96™, CFX384™, CFX Connect™, MJOpticon, Opticon 2; (Cepheid) SmartCycler® System, Smart Cyclyer II System; (Roche) LightCycler® 2.0, 480, 96; (Qiagen) Rotor-Gene® Q, 3000, 6000; (Bioer) Line-Gene; (Eppendorf) Mastercycler ep realplex; (Analytik Jena) qTOWER3.
添加 AG11703 (终浓度为 0.4 μ M)	(Thermo) ABI7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus.
添加 AG11710 (终浓度为 0.08 μ M)	(Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™ 7, QuantStudio™ 3 / 5, QuantStudio™ 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™ Dx; (Agilent) Mx3000P™, Mx3005P™, MX4000™.

➤ 操作方法

(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System 为例)

1) 配制 PCR 反应液

组分名称	20 μ l 体系	50 μ l 体系
2X SYBR Green <i>Pro Taq</i> HS Premix II	10 μ l	25 μ l
Template ^{*1}	≤ 100 ng	≤ 200 ng
Primer F (10 μ M) ^{*2}	0.8 μ l	2 μ l
Primer R (10 μ M) ^{*2}	0.8 μ l	2 μ l
ROX Reference Dye (4 μ M) ^{*3, 4}	0.4 μ l	1 μ l
RNase free water	up to 20 μ l	up to 50 μ l

*1: 在 20 μ l 体系里, DNA 模板添加量通常不高于 100 ng; 在 50 μ l 体系里, DNA 模板添加量通常不高于 200 ng。必要时可以将模板 DNA 进行稀释, 以确定合适的模板添加量。如果使用本产品进行 cDNA 的定量 PCR 扩增, cDNA 原液使用体积不要超过定量 PCR 反应总体积的 10%。

*2: 引物通常使用终浓度为 0.4 μ M, 可根据实际情况在 0.1 ~ 1.0 μ M 范围内调整。

*3: 请按照不同仪器推荐的反应体系配制反应液。如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准, 请按照仪器推荐量添加。

*4: 若不需要使用 ROX 的 PCR 仪, ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。

2) qPCR 反应条件

两步法 PCR 反应程序^{*1}:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec ^{*2}	1
变性	95°C	5 sec	} 40
退火和延伸 ^{*4}	60°C ^{*3}	30 sec ^{*3}	
熔解曲线采集 ^{*5}	95°C	15 sec	} 1
	60°C	1 min	
	95°C	1 sec	

*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件; 如果引物 T_m 值较低, 导致两步法扩增效率较差, 可采用三步法进行 PCR 扩增 (三步法 PCR 反应程序可参考附录)。

*2: 预变性时间通常设定为 30 sec, 如果模板变性困难, 可以延长预变性时间至 1 ~ 2 min。

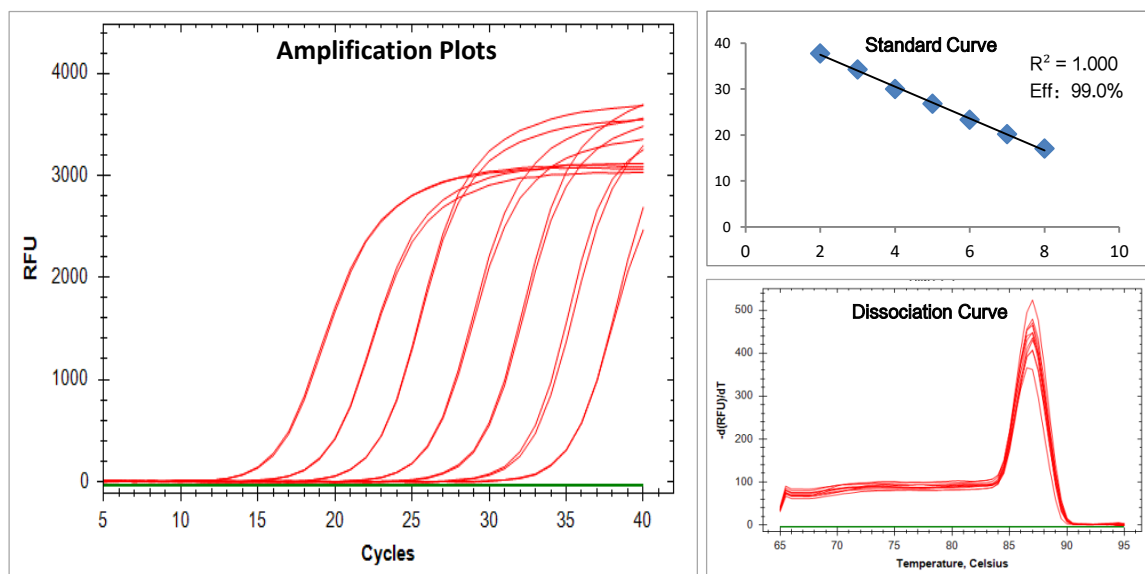
- *3: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增延伸反应条件设定为 60°C、30 sec 时可以满足要求; 如需提高反应特异性, 可适当提高退火温度; 如需提高扩增效率, 或者 PCR 扩增产物较长, 则可将反应延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。
- *4: 此步骤进行荧光信号值采集。
- *5: 此步为必须步骤, 此熔解曲线为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems Standard 模式下默认程序。不同仪器的熔解曲线采集程序不同, 选用仪器对应的默认程序即可。

➤ 结果检测

反应结束后, 确认扩增曲线和熔解曲线, 并进行标准曲线分析。
(分析方法请参照仪器操作手册)

➤ 实验例

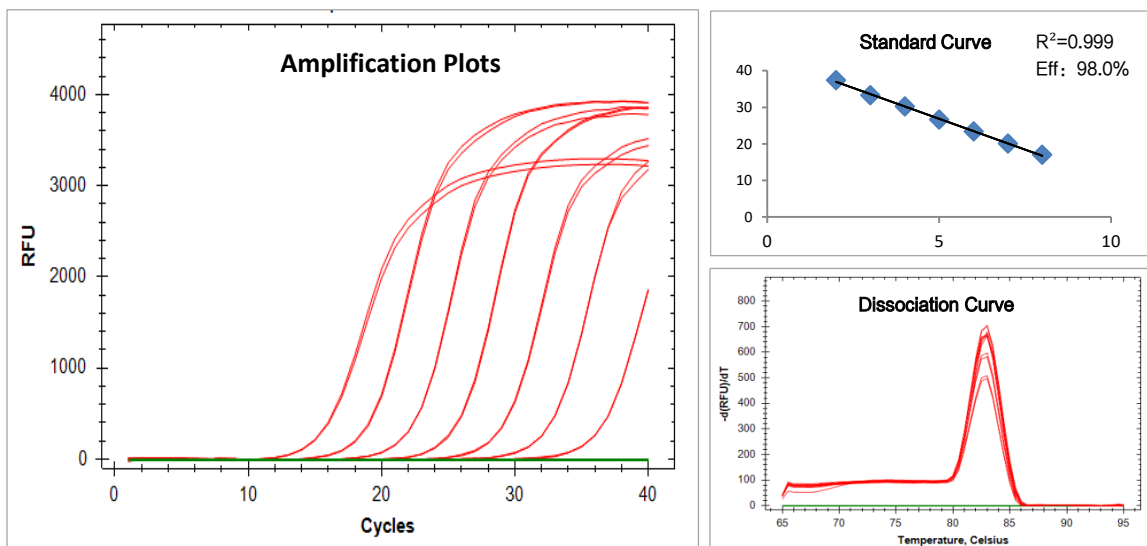
1. 使用本产品进行两步法荧光定量 RT-qPCR 检测 Human $\beta Actin$ 基因, 模板 cDNA 添加量 (相当于 Total RNA 量) 为 100 ng ~ 0.1 pg。cDNA 的合成使用本公司的 *Evo M-MLV* 反转录试剂预混液(用于 qPCR) (Code No. AG11706)。结果如下:



结果如上图: 1、工作曲线 $R^2=1.000$, 扩增效率 99.0%。

- 2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量, 100 ng ~ 0.1 pg cDNA 浓度 (相当于 Total RNA 量) 范围内扩增曲线呈现良好的线性关系。
- 3、熔解曲线峰型单一、无杂峰, 扩增特异性强。

2. 使用本产品进行两步法荧光定量 RT-qPCR 检测 Mouse *malat1* 基因, 模板 cDNA 添加量 (相当于 Total RNA 量) 为 100 ng ~ 0.1 pg。cDNA 的合成使用本公司的 *Evo M-MLV* 反转录试剂预混液(用于 qPCR) (Code No. AG11706)。结果如下:



结果如上图: 1、工作曲线 $R^2=0.999$, 扩增效率 98.0%。

2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量, 100 ng ~ 0.1 pg cDNA 浓度 (相当于 Total RNA 量) 范围内扩增曲线呈现良好的线性关系。

3、熔解曲线峰型单一、无杂峰, 扩增特异性强。

➤ 产品注意事项

1. 合适的模板加入量及浓度

- ❖ 模板量低: 导致扩增结果 Ct 值较大, 荧光信号值较低, PCR 反应扩增效率较低, 反应结果重复性较差, 扩增曲线形状异常。可适当提高模板量。
- ❖ 模板量高: 导致 Ct 值太小、扩增荧光信号值太高, 扩增曲线形状异常。可适当降低模板量。
- ❖ 模板浓度高: 模板取液量体积较小, 导致模板加样体积不准, 实验重复性差; 可将模板适当稀释后加样。

2. 高纯度及完整的模板

- ❖ 模板不纯: 含有抑制 PCR 反应的物质, 会导致扩增结果 Ct 值较大, PCR 反应扩增效率较低。可对模板重新提纯。针对 cDNA 的定量反应中, 熔解曲线出现多峰, 可能是 RNA 模板中混有基因组 DNA, 导致反应特异性不好。可先使用本公司的 *Evo M-MLV* 反转录预混型试剂盒 (含去除 gDNA 试剂, 用于 qPCR) Ver.2 (Code No. AG11728) 去除模板中的基因组 DNA。

- ❖ 模板降解：导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。可重新制备模板，重复实验。

3. 合适的引物浓度

- ❖ 引物浓度低：导致反应效率低，Ct 值较大。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度高：导致反应特异性不好，熔解曲线出现多峰。可适当降低引物浓度。
- ❖ 引物特异性不好：导致反应特异性不好，易形成了引物二聚体，熔解曲线出现多峰。建议重新设计引物。
- ❖ 引物完整性不好：可能会导致无扩增曲线，可通过 PAGE 电泳确认引物的完整性，如引物有降解，建议更换引物。
- ❖ 引物设计的原则：
 - ① 引物一般是 15 ~ 30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40 ~ 60% 之间。
 - ② 建议正反向引物 Tm 值在 50 ~ 70℃，两引物 Tm 值相差不超过 5℃。
 - ③ 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
 - ④ 引物 3' 端避免出现发夹结构。
 - ⑤ 减少引物之间的互补序列，最好不要超过 4 个碱基连续互补序列。

4. 合适的退火温度

- ❖ 退火温度过低：导致反应特异性不好，出现引物二聚体，熔解曲线出现多峰。适当提高退火温度。
- ❖ 退火温度过高：导致扩增效率低，无扩增曲线。适当降低退火温度。

5. 实验细节

- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡。
- ❖ 本产品-20℃存放可能会产生淡黄色或白色沉淀，使用前确保完全融化并混匀。
- ❖ 确认 ROX 与仪器是否匹配，ROX 使用前确保完全融化并混匀。
- ❖ 检查反应程序，确保反应程序设置正确。

➤ 附录：三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	5 sec	40
退火	55°C	30 sec	
延伸 ^{*1}	72°C	30 sec	
熔解曲线采集 ^{*2}	95°C	15 sec	1
	60°C	1 min	
	95°C	1 sec	

*1：此步骤进行荧光信号值采集。

*2：此步为必须步骤，此熔解曲线为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems Standard 模式下默认程序。不同仪器的熔解曲线采集程序不同，选用仪器对应的默认程序即可。