

Version 1

Cat No. AG11741

SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 II (含高 ROX)

SYBR Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit II (High ROX Plus)

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

本制品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 的试剂盒，是一种 2X 预混液，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，使用方便。本制品是在 SYBR Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit II (Code. AG11702) 产品基础上预混了高浓度 ROX 的 2X Premix 试剂，无需额外添加 ROX，方便使用（反应中 ROX 的终浓度为 $0.4 \mu\text{M}$ ）。

本制品中 SYBR Green I 浓度、PCR 反应体系都进行了优化，采用了反应性能优越的 *Pro Taq* HS 体系，其混合了能在常温下抑制 Taq 酶活性的单克隆抗体，从而可以有效抑制非特异性扩增，提高 PCR 扩增效率，同时能够在宽广的定量区域内获得良好的工作曲线，对靶基因进行准确定量检测。

➤ 产品组成

组分名称	AG11741 (500 rxns / 20 μl)
2X SYBR Green <i>Pro Taq</i> HS Premix II (High Rox Plus)	1 ml X 5 pcs

➤ 保存

保存温度：-20°C（避光保存）

运输温度：干冰运输或 -20°C 冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本制品是一种 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. 本制品对 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。
3. 本制品预混了 ROX Reference Dye，方便使用，有效地减少单加 ROX 带来的实验误差。适用于高浓度 ROX 校准的定量 PCR 仪，或不需要校准的定量 PCR 仪。

➤ 实验原理

1. PCR 扩增原理

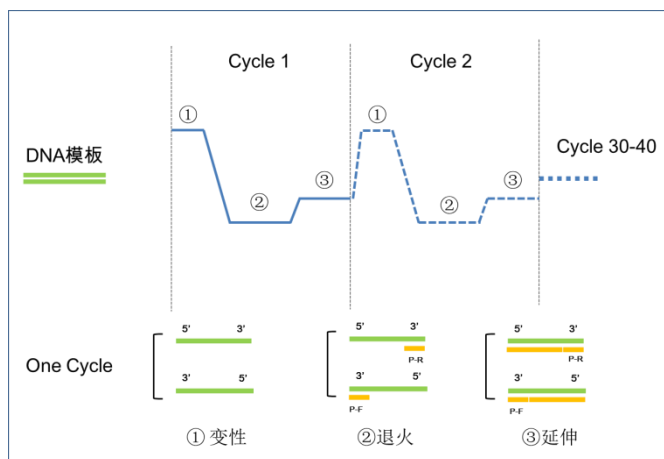
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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；

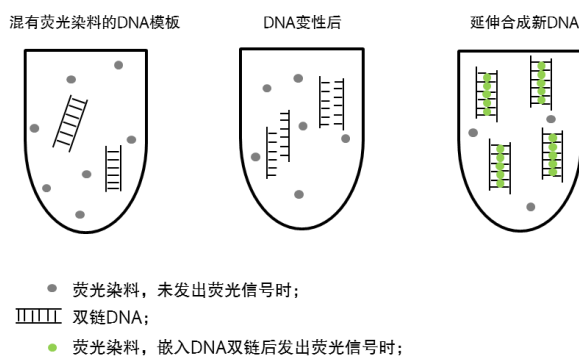
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

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。
- 本制品中配有 ROX Reference Dye，可以校正孔间荧光信号值误差，无需额外添加。
- 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℃ 存放可能会产生沉淀，使用前可于冰上溶解或手握溶解，颠倒混匀至沉淀全部消失。注意请勿使用涡旋振荡。

➤ 实验前准备

1) 试剂 & 耗材：

Primer, DNA 模板、RNase free water、定量 PCR tube、无菌无酶枪头。

2) 仪器：

	仪器
无需添加 ROX	(Bio-Rad)IQ5, CFX 96™, CFX 384™, CFX Connect™, MJOpticon, Opticon 2; (Cepheid) SmartCycler® System, Smart Cycler II System; (Roche) LightCycler® 2.0, 480, 96; (Qiagen) Rotor-Gene™ Q, 3000, 6000; (Bioer) Line-Gene; (Eppendorf) Mastercycler ep realplex; (Analytik Jena) qTOWER3;
添加高浓度 ROX (终浓度为 0.4 μM)	(Thermo) ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus;

➤ 操作方法

(以 ABI StepOne Real-Time PCR System 为例)

1) 配制 PCR 反应液

组分名称	20 μl 体系	50 μl 体系
2X SYBR Green Pro Taq HS Premix II (High Rox Plus) ^{*1}	10 μl	25 μl
Template	≤100 ng ^{*2}	≤250 ng
Primer F (10 μM) ^{*3}	0.8 μl	2 μl
Primer R (10 μM) ^{*3}	0.8 μl	2 μl
RNase free water	Up to 20 μl ^{*4}	Up to 50 μl ^{*4}

*1: 反应体系中 ROX 终浓度为 0.4 μM。该溶液要避免反复冻融，防止酶活降低；使用前可上下颠倒混匀，请勿涡旋振荡混匀；产品中含有 SYBR Green I，操作过程中注意避光。

*2: 在 20 μl 体系里，DNA 模板添加量通常不高于 100 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。如果使用本制品进行 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%。

*3: 引物通常使用终浓度为 $0.4 \mu\text{M}$, 当反应结果差时可以在 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{M}$ 范围内调整。

*4: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。

2) qPCR 反应条件

两步法 PCR 反应程序^{*1}:

步骤	温度	时间	循环数	
Step 1	95°C	30 sec ^{*2}		1
Step 2	95°C	5 sec	}	40
	60°C ^{*3}	30 sec ^{*3}		
Step 3	Dissociation stage			

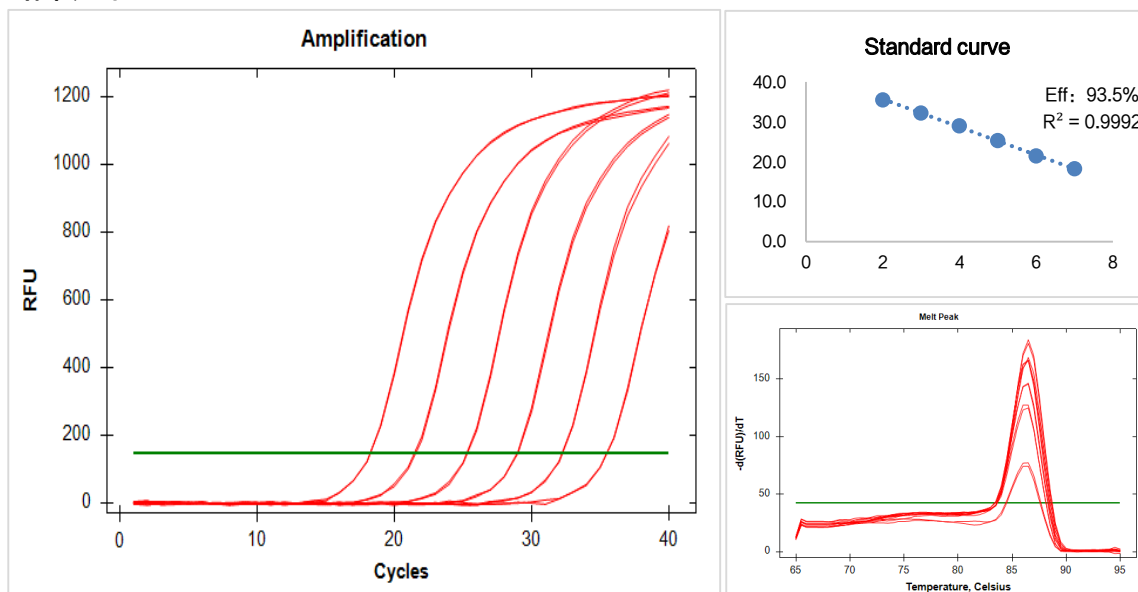
*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件; 如果引物 T_m 值较低, 导致两步法扩增效率较差, 可采用三步法进行 PCR 扩增 (三步法 PCR 程序可参考附录)。

*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, 可适当提高延伸温度; 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。

➤ 实验例

1. 采用本试剂盒进行荧光定量检测 Mouse *GAPDH* Gene (GC 含量 56%), cDNA 模板加量 (相当于 Total RNA 量) 为 10 ng ~ 100 fg。cDNA 的合成使用本公司的 *Evo M-MLV* 反转录预混型试剂盒 (含去除 gDNA 试剂, 用于 qPCR) (Code. AG11728)。
所用定量仪器: Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (无需 ROX 校准)。
结果如下:



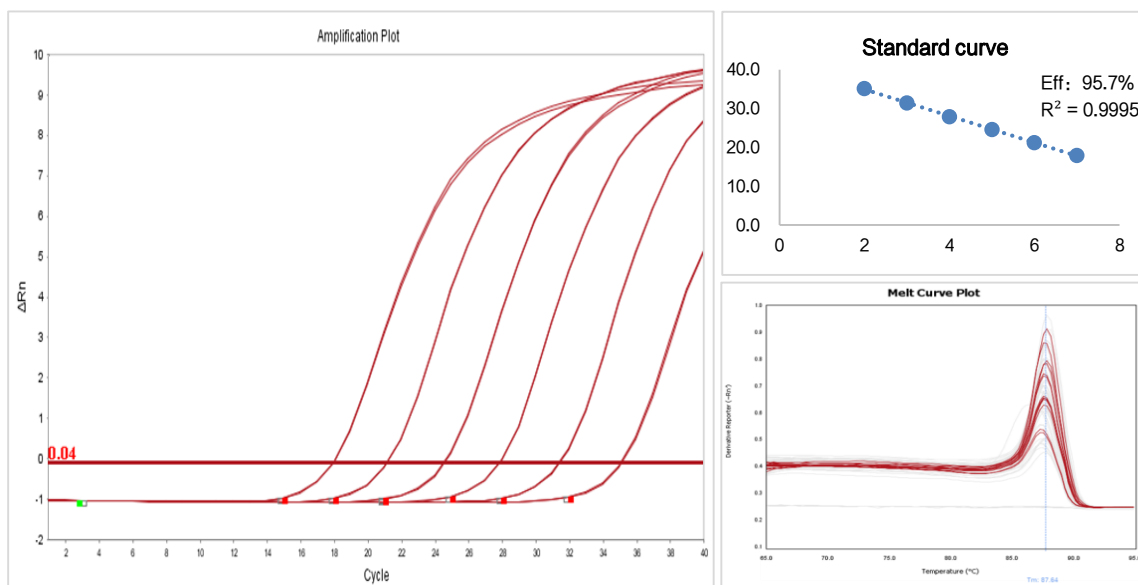
结果如上图：1、工作曲线 $R^2 = 0.9992$ ，扩增效率 93.5%。

2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量，10 ng ~ 100 fg 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、溶解曲线峰型单一、无杂峰，扩增特异性强。

2. 采用本试剂盒进行荧光定量检测 Mouse *GAPDH* Gene (GC 含量 56%)，cDNA 模板添加量（相当于 Total RNA 量）为 10 ng ~ 100 fg。cDNA 的合成使用本公司的 *Evo M-MLV* 反转录预混型试剂盒(含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR) (Code. AG11728)。

所用定量仪器：ABI StepOne Real-Time PCR System（需 ROX 校准）。结果如下：



结果如上图：1、工作曲线 $R^2 = 0.9995$ ，扩增效率 95.7%。

2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量，10 ng ~ 100 fg 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、溶解曲线峰型单一、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）(Code. 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，出现非特异性扩增，形成引物二聚体，熔解曲线出现多峰。可适当提高退火温度。
- ❖ 退火温度过高：导致扩增效率低，无扩增曲线。可适当降低退火温度。

5. 实验细节

- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡。
- ❖ 本产品 -20℃ 存放可能会产生沉淀，使用前确保完全溶解并混匀。
- ❖ 确认 ROX 与仪器是否匹配。
- ❖ 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
Step 1	95°C	30 sec	1
Step 2	95°C	5 sec	40
	55°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
Step 3	Dissociation stage		