

Version 3

Cat No. AG11735

SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 (含示踪染料, 含 Rox)

SYBR Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Tracking Kit (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 嵌合荧光法进行 qPCR 的专用试剂，2X Premix 中预混了 ROX Reference Dye，反应中 ROX 的终浓度为 $0.08 \mu\text{M}$ ，无需额外添加，方便使用。同时，2X Premix 中添加了蓝色染料，搭配黄色模板稀释液【40X Dilution Buffer (Yellow)】，实现移液过程可视化：将黄色稀释液与模板混匀后，加入到蓝色的反应液中，溶液会从蓝色变成绿色，可根据颜色变化确认是否添加模板，有利于大量样品的加样，减少了误操作概率。

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（混合了 Taq 抗体），能够有效抑制非特异性扩增，提高 PCR 扩增效率，可以在宽广的定量区域内得到良好的工作曲线，对靶基因进行准确定量检测。

➤ 产品组成

组分名称	AG11735 (500 rxns / 20 μl)
2X SYBR Green <i>Pro Taq HS</i> Premix (Blue, Rox Plus)	1 ml X 5 pcs
40X Dilution Buffer (Yellow)	500 μl

➤ 保存

保存温度：-20°C（避光保存）

运输温度：-20°C冰袋运输或干冰运输

➤ 产品优势

1. 2X Premix 中添加了蓝色染料，搭配黄色模板稀释液，实现移液过程可视化，提高加样效率，降低误操作概率。
2. 2X SYBR Green *Pro Taq HS* Premix (Blue, Rox Plus) 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。
3. 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。
4. 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。

➤ 实验原理

1. PCR 扩增原理

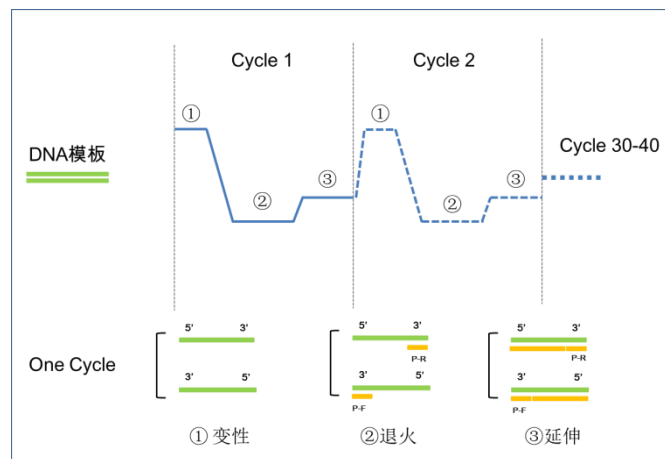
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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；

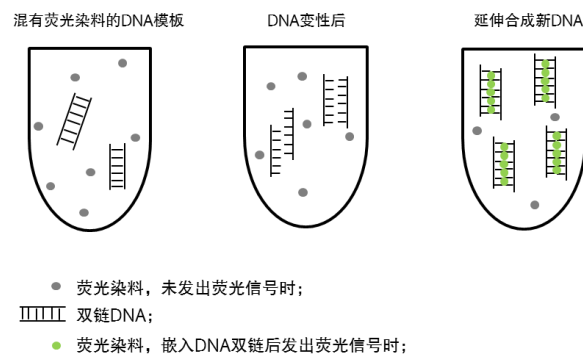
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

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。
- 本制品中含有 ROX Reference Dye，用以校正孔间荧光信号值误差，反应时 ROX 的终浓度为 $0.08 \mu\text{M}$ ，请参照说明书选择仪器，并参照仪器说明书使用。
- 2X SYBR Green *Pro Taq* HS Premix (Blue, Rox Plus) 避免反复冻融，防止酶活降低；同时，该溶液中含有 SYBR Green I，因此操作过程中要注意避免强光照射。
- 2X SYBR Green *Pro Taq* HS Premix (Blue, Rox Plus) -20°C 存放可能会产生沉淀，使用前可于冰上溶解或手握放置，可上下颠倒混匀至沉淀全部消失，请勿使用涡旋振荡。同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。

➤ 实验前准备

1) 试剂& 耗材：

Primer, 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, CFX96™, CFX384™, 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; (TaKaRa) Thermal Cycler Dice™ TP700, TP760, TP900, TP960, TP950, TP970, TP980, TP990;
添加 ROX (终浓度为 $0.08 \mu\text{M}$)	(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 Systems 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 (Blue, Rox Plus) *1	10 μ l	25 μ l
Template	≤ 100 ng ^{*2}	≤ 250 ng
40X Dilution Buffer (Yellow) *4	0.5 μ l	1.25 μ l
Primer F (10 μ M) *5	0.4 μ l	1 μ l
Primer R (10 μ M) *5	0.4 μ l	1 μ l
RNase free water	Up to 20 μ l ^{*6}	Up to 50 μ l ^{*6}

*1: 该溶液避免反复冻融, 防止酶活降低; 使用前可上下颠倒混匀, 请勿涡旋振荡混匀; 溶液中含有 SYBR Green I 和 ROX, 操作过程中注意避免强光照射。

*2: 在 20 μ l 体系里, DNA 模板添加量通常建议 ≤ 100 ng; 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%。必要时可以将模板进行梯度稀释, 以确定合适的模板添加量。

*3: 如果不需要模板移液示踪, 可不使用 40X Dilution Buffer (Yellow), 用 RNase free water 代替。如果需要模板移液示踪, 请先将模板与 40X Dilution Buffer (Yellow) 混匀, 再加入至反应预混液中; 若模板需要稀释, 应先用 RNase free water 稀释模板, 再按比例添加 40X Dilution Buffer (不能使用 Dilution Buffer 替代 RNase free water 稀释模板)。

例如, 定量体系为 20 μ l, 加入 2 μ l 的 cDNA 模板和 0.5 μ l 的 40X Dilution Buffer (Yellow), 具体操作如下: 在 10 μ l cDNA 模板中加入 2.5 μ l 40X Dilution Buffer, 然后加 2.5 μ l 的混有 Dilution Buffer 的模板至蓝色的预混液中。

*4: 40X Dilution Buffer (Yellow) 建议按照上述表格中推荐量加入, 用量过多可能会影响扩增性能, 用量过少可能颜色变化不明显。

*5: 引物通常使用终浓度为 0.2 μ M, 也可以在 0.1 ~ 1.0 μ M 范围内调整。

*6: 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	30 sec ^{*3}	
Step 3	Dissociation stage		

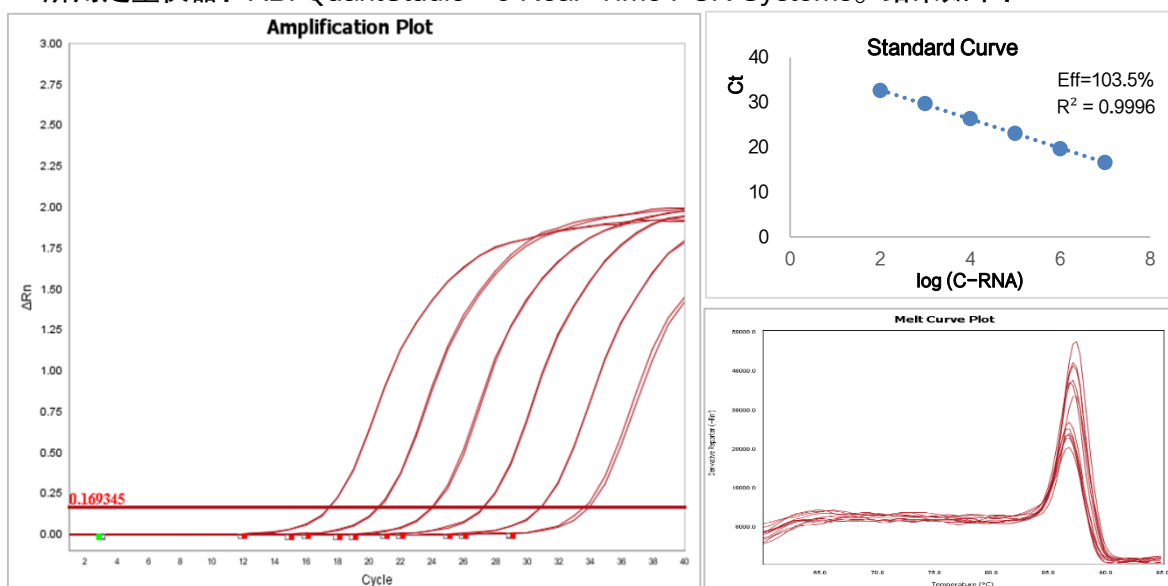
*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件; 如果引物 T_m 值较低, 导致两步法扩增效率较差, 可采用三步法进行 PCR 扩增 (三步法 PCR 程序可参考附录)。

*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。

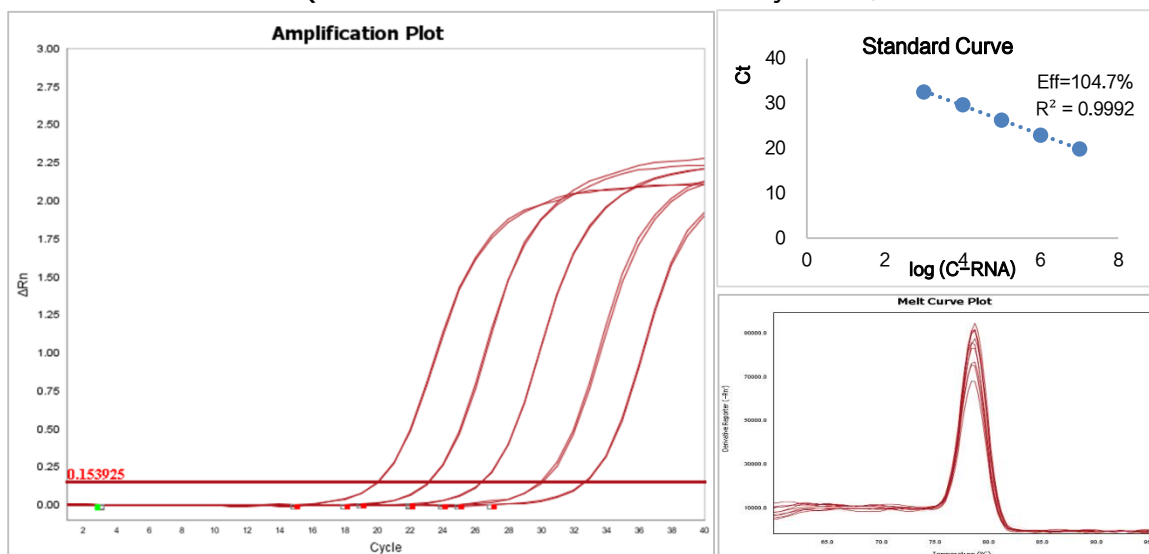
➤ 实验例

1. 采用本试剂盒进行荧光定量 RT-PCR 检测 Mouse *GAPDH* Gene (GC 含量 56.1%), cDNA 模板添加量 (相当于 Total RNA 量) 为 10 ng ~ 100 fg。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) 合成 cDNA。所用定量仪器: ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。结果如下:



结果如上图: 1、工作曲线 $R^2=0.9996$, 扩增效率 103.5%。

- 2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量，10 ng ~ 100 fg 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. 采用本试剂盒进行荧光定量 RT-PCR 方法检测 Human *TFR* Gene(GC 含量 38%)，模板 cDNA 添加量(相当于 Total RNA 量)为 10 ng ~ 1 pg。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) 合成 cDNA。所用定量仪器：ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。结果如下：



结果如上图：1、工作曲线 $R^2 = 0.9992$ ，扩增效率 104.7%。

- 2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量，10 ng ~ 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：① 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。② RNA 模板中混有基因组 DNA，会导致反应特异性不好，熔解曲线出现多峰。可对模板重新提纯。
- ❖ 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，重复试验。
- ❖ 稀释模板时，40X Dilution Buffer (Yellow) 的用量建议按照说明书推荐的加入：20 μ l 反应体系中加入 0.5 μ l，用量过多可能会影响扩增性能，用量过少可能颜色变化不明显。
- ❖ 模板需要稀释时，应先用 RNase free water 正常稀释，再添加 Dilution Buffer（不能使用 Dilution Buffer 替代 RNase free water 稀释模板）。

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°C，两引物 Tm 值相差不超过 5°C。
 - 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°C 存放可能会产生沉淀，使用前确保完全融化并混匀。
- ❖ 确认产品中 ROX 浓度与仪器是否匹配。
- ❖ 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		