

Version 2

Code No. AG11756

SYBR Green Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (含 UNG)

SYBR Green Premix Taq HS qPCR Kit (UNG 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

本产品是利用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 的试剂盒,是一种 2X premix 型试剂,反应液配制十分简单,仅需加入引物、模板及 RNase free water 即可。同时,本产品采用了反应性能优越的 *Accurate Taq HS DNA polymerase* 体系,可以进行高灵敏度的 Real Time PCR 反应,从而实现靶基因的准确定量与检测。

本产品中还引入了 dUTP/UNG 防污染系统,在 PCR 反应过程中以 dUTP 取代 dTTP,利用 UNG 酶能选择性水解含 dU 的 DNA 链,而对不含 dU 的 DNA 链没有任何影响的特性,除去 PCR 反应体系配制过程中引入的含 dU 的污染模板,从而可有效防止 PCR 假阳性结果的产生,提高实验结果的准确性。

➤ 产品组成

组分名称	AG11756 (500 rxns / 20 μ l)
2X SYBR Green Taq HS Premix (UNG Plus)*	1 ml X 5 pcs

*: 溶液在-20°C存放时可能会产生白色或淡黄色的沉淀,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。请勿涡旋振荡。

➤ 保存及运输

保存温度: -20°C保存(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。
3. 本产品中引入了 dUTP/UNG 防污染系统,可除去含 dU 的 PCR 产物污染,从而有效防止出现 PCR 假阳性结果,提升实验结果的准确性。

➤ 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

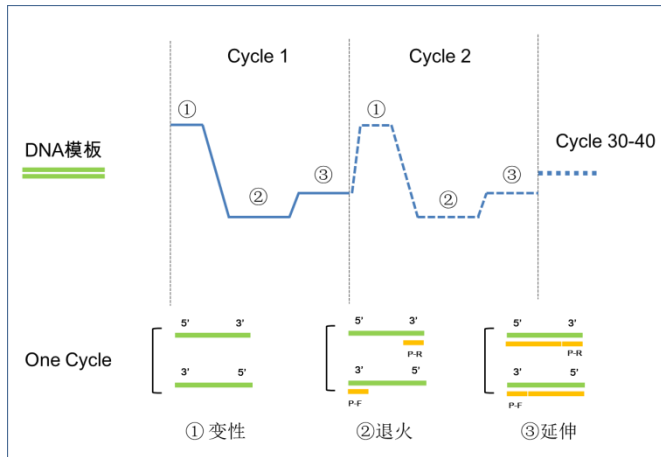
步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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；

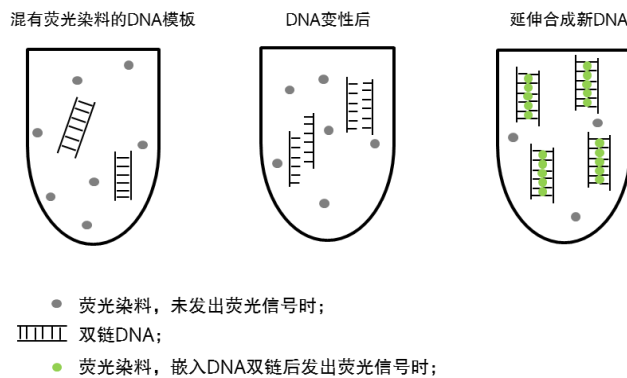
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

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

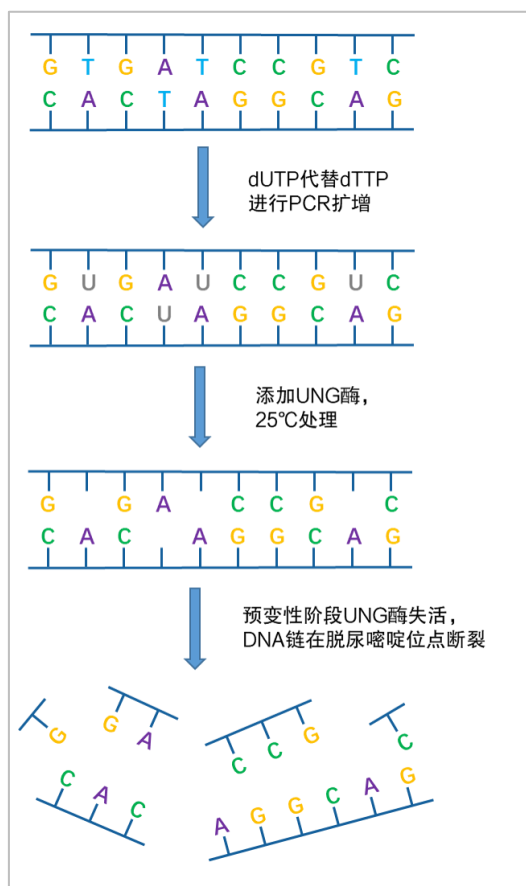
SYBR Green I 荧光染料嵌合法利用 SYBR Green I 与双链 DNA 结合后发出荧光的原理，首先将荧光染料 SYBR 加入 PCR 反应液中，在 PCR 扩增的延伸过程中，SYBR Green I 可以嵌合到双链 DNA 双螺旋小沟区域并发出荧光，此时通过检测反应进程中的荧光信号值，达到对靶标基因进行定性/定量分析的目的。



3. dUTP/UNG 防污染系统作用原理

扩增产物所形成的气溶胶，是 PCR 反应中最主要的污染源之一。扩增产物中片段拷贝数大，即使极微量体积的气溶胶，其片段拷贝数也远远超过 PCR 检测下限，从而造成后续 PCR 反应的假阳性结果。由于气溶胶难以通过常规方法去除，因此 UNG 酶应运而生。

尿嘧啶-N-糖基化酶（Uracil-N-glycosylase, UNG）可以选择性水解双链或单链 DNA 中尿嘧啶脱氧核糖核苷酸（dU）中的尿嘧啶糖苷键。如果在 PCR 反应中用 dUTP 代替 dTTP，使 PCR 扩增产物都是带有 dU 的 DNA 链，并在后续 PCR 反应开始前增加 25°C 的恒温步骤，那么 PCR 体系中污染模板的尿嘧啶碱基会因 UNG 酶特异性切割 β -N 尿嘧啶糖苷键而从 DNA 链上脱离，产生脱嘧啶位点。当反应经过预变性阶段热处理后，DNA 污染模板在脱嘧啶位点处断裂，从而无法被扩增，避免了假阳性结果的产生，同时 UNG 酶被灭活，不再降解新产生的含有 dU 的 DNA 产物。



➤ 使用注意事项

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。

5. 产品-20°C存放可能会产生白色或淡黄色沉淀，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, PCR grade water、定量 PCR tube、带滤芯枪头。

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) Mastercyclereprealplex
	(Analytik Jena) qTOWER3
	(TaKaRa) Thermal Cycler Dice™ TP950
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 Systems 为例)

1. 配制 PCR 反应液^{*1}

组分名称	20 μl 体系	50 μl 体系
2X SYBR Green Taq HS Premix (UNG Plus) ^{*2}	10 μl	25 μl
Primer F (10 μM) ^{*3}	0.4 μl	1 μl
Primer R (10 μM) ^{*3}	0.4 μl	1 μl
ROX Reference Dye (4 μM) ^{*4}	0.4 μl	1 μl
Template ^{*5}	≤100 ng	≤250 ng
RNase free water	Up to 20 μl	Up to 50 μl

*1: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。

*2: 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; 产品中含有 SYBR Green I, 操作过程中注意避光。

*3: 引物通常使用终浓度为 0.2 μM, 当反应结果差时可以在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整。

*4: 若需要使用 ROX 进行荧光信号校准, 请按照仪器推荐量添加。若不需要使用 ROX 进行荧光信号校准, ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。

*5: 在 20 μl 体系里, DNA 模板添加量通常在 100 ng 以下, 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. qPCR 反应条件 (两步法 PCR 反应程序^{*1})

步骤	温度	时间	循环数
UNG 处理	25°C	10 min ^{*2}	1
预变性	95°C	30 sec ^{*3}	1
变性	95°C	5 sec	} 40
退火和延伸 ^{*5}	60°C	30 sec ^{*4}	
熔解曲线采集步骤	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 Tm 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。

*2: 建议在 25°C, 10 min 条件下进行 UNG 处理, 能够充分降解含 dU 的污染模板; 可根据实际需求在 5 ~ 10 min 范围内调整处理时间。

*3: 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。

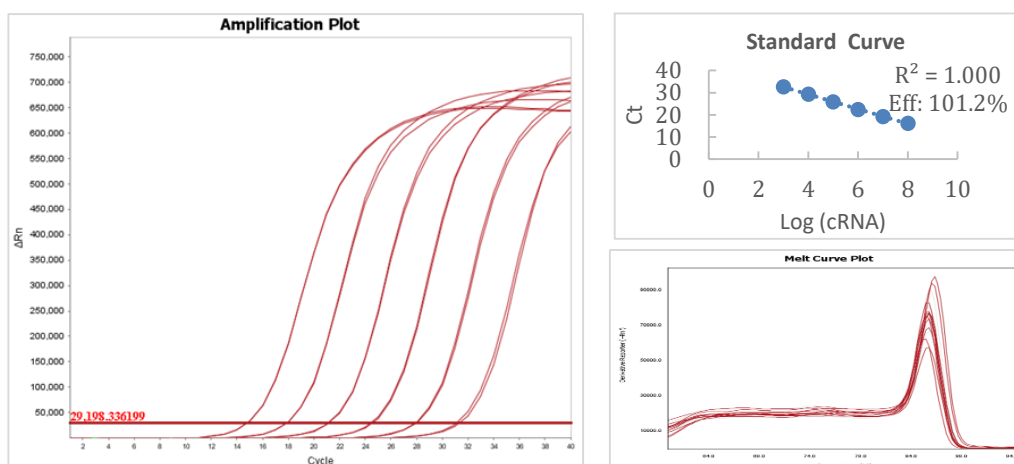
*4: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增延伸反应条件设定为 60°C、30 sec 时可以

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（三步法 qPCR 反应程序可参考附录）。

*5: 此步骤进行荧光信号值采集。

➤ 实验例

1. 采用本试剂盒进行荧光定量 PCR 检测 Mouse *GAPDH* 基因，cDNA 模板添加量（相当于 Total RNA 量）为 100 ng ~ 1 pg。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）Ver.2 (Code No. AG11728)。所用定量仪器为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。结果如下：

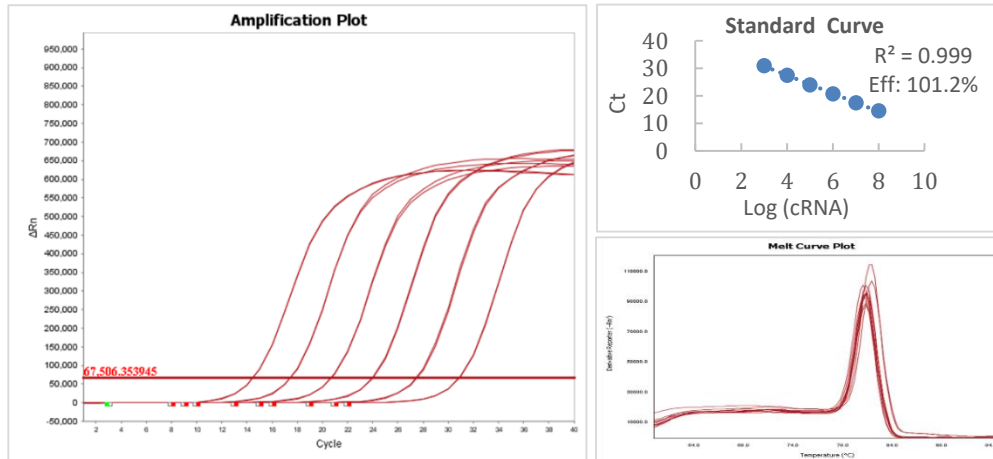


结果如上图所示：1、工作曲线 $R^2=1.000$ ，扩增效率 101.2%。

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

2. 采用本试剂盒进行荧光定量 PCR 检测 Mouse *malat1* 基因，cDNA 模板添加量（相当于 Total RNA 量）为 100 ng ~ 1 pg。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）Ver.2 (Code No. AG11728)。所用定量仪器为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。结果如下：



结果如上图所示：1、工作曲线 $R^2=0.999$ ，扩增效率 101.2%。

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

➤ 产品注意事项

1. 合适的模板加入量及浓度

- ❖ 模板量低：可能会导致扩增结果 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。可适当提高模板量。
- ❖ 模板量高：可能会导致扩增结果 Ct 值较小，荧光信号值较高，扩增曲线异常。可适当降低模板量。
- ❖ 模板浓度高：模板取液量体积较小，可能会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，可能会导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。可重新纯化模板。
- ❖ 模板降解：可能会导致扩增结果 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

- ❖ 引物浓度低：可能会导致反应效率低，扩增结果 Ct 值较大。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度高：可能会导致反应特异性不好。可适当降低引物浓度。
- ❖ 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, 尽量减小两者的 Tm 值差, 并使差值不超过 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, 一般不要超过 4 个碱基连续互补序列, 尤其是 3' 端, 否则可能会形成引物二聚体, 影响实验结果。

4. 合适的退火温度

- ❖ 退火温度过低: 可能会导致反应特异性不好, 或形成引物二聚体。可适当提高退火温度。
- ❖ 退火温度过高: 可能会导致扩增效率低, 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°C 存放可能会产生白色或淡黄色沉淀, 使用前确保完全融化并混匀。
- ❖ 确认 ROX 浓度与仪器是否匹配, 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
UNG 处理	25°C	10 min	1
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	
熔解曲线采集步骤	Dissociation stage		

*1: 此步骤进行荧光信号值采集。