

Version 1

Code No. AG11759

SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 (高 GC)

SYBR Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit (GC rich)

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。本产品对 SYBR Green I 浓度及 PCR 反应体系都进行了优化，并添加了相关辅助蛋白，大大提升了复杂模板（如 GC 含量大于 60%）的扩增性能，对普通 GC 含量的模板也具有良好的扩增性能，同时本产品采用了反应性能优越的 *Pro Taq* HS DNA polymerase 体系，能够有效抑制非特异性产物的扩增，提高 PCR 扩增效率，可以进行高灵敏度的 Real Time PCR 反应，在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，从而对靶基因进行准确定量、检测。

➤ 产品组成

组分名称	AG11759 (500 rxns / 20 μ l)
2X SYBR Green <i>Pro Taq</i> HS Premix (GC rich) *	1 ml X 5 pcs

*: 溶液在-20℃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℃保存（避光保存）

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，同时添加了辅助蛋白，大大提升了复杂模板（如 GC 含量大于 60%）的扩增性能。
3. 本产品有很高的检测灵敏度，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。

➤ 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

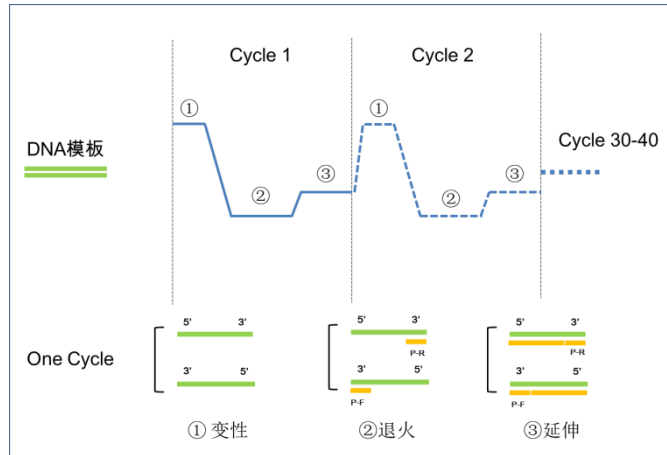
步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

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；

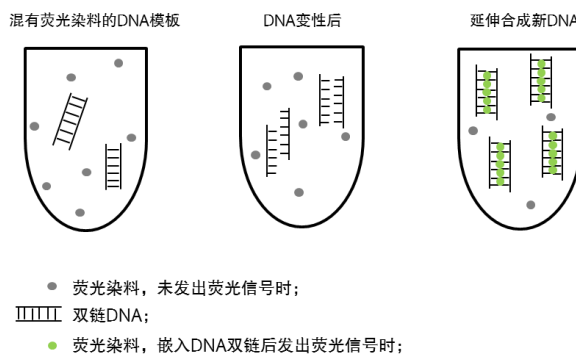
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

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

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, 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 μM)

(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 <i>Pro Taq</i> HS Premix (GC rich) ^{*2}	10 μl	25 μl
Template ^{*3}	≤ 100 ng	≤ 250 ng
Primer F (10 μM) ^{*4}	0.4 μl	1 μl
Primer R (10 μM) ^{*4}	0.4 μl	1 μl
ROX Reference Dye (4 μM) ^{*5}	0.4 μl	1 μl
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: 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%。

*4: 引物通常使用终浓度为 0.2 μM 可以达到较好的扩增效果; 如果扩增效率低可提升引物用量至 0.4 μM; 如果存在非特异性扩增可降低引物用量; 也可以根据扩增情况在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整。

*5: 若所选仪器需要使用 ROX 进行荧光信号校准, 请按照仪器推荐量添加; 若所选仪器不需要使用 ROX 进行荧光信号校准, ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。

2. qPCR 反应条件 (两步法 PCR 反应程序^{*1})

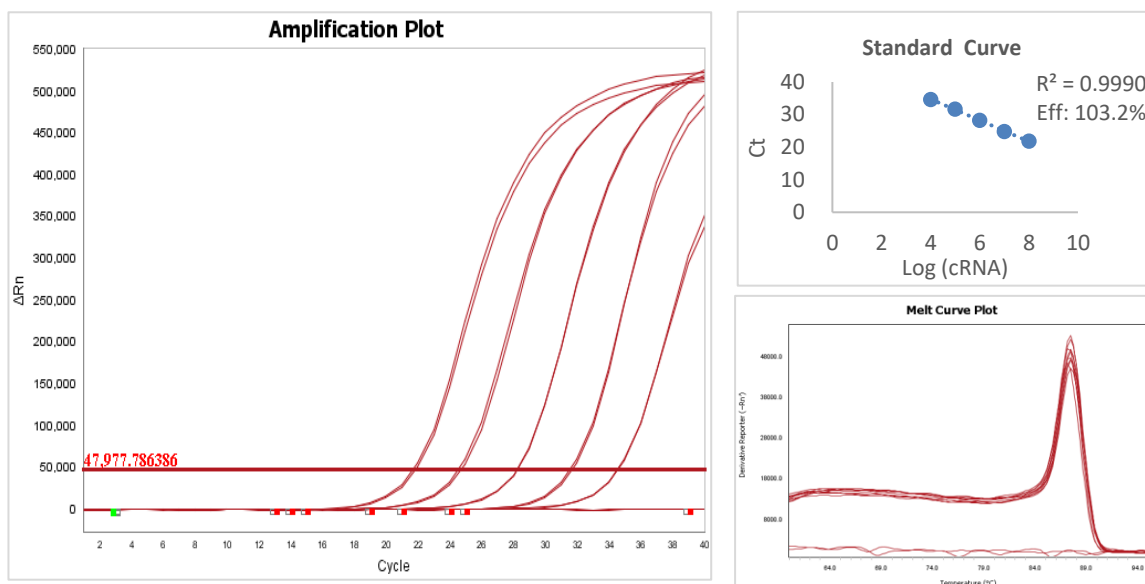
步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec ^{*2}	1
变性	95°C	5 sec	} 40
退火和延伸 ^{*4}	60°C	30 sec ^{*3}	
熔解曲线采集步骤	Dissociation stage		

*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: 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 扩增产物建议设计在 200 bp 以下。扩增延伸反应条件设定为 60°C、30 sec 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 PCR 反应程序可参考附录)。
- *4: 此步骤进行荧光信号值采集。

➤ 实验例

1. 采用本产品进行荧光定量检测 Human *WNT5A* (GC 含量为 72%) 基因, cDNA 模板添加量 (相当于 Total RNA 量) 为 100 ng ~ 10 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)。结果如下:

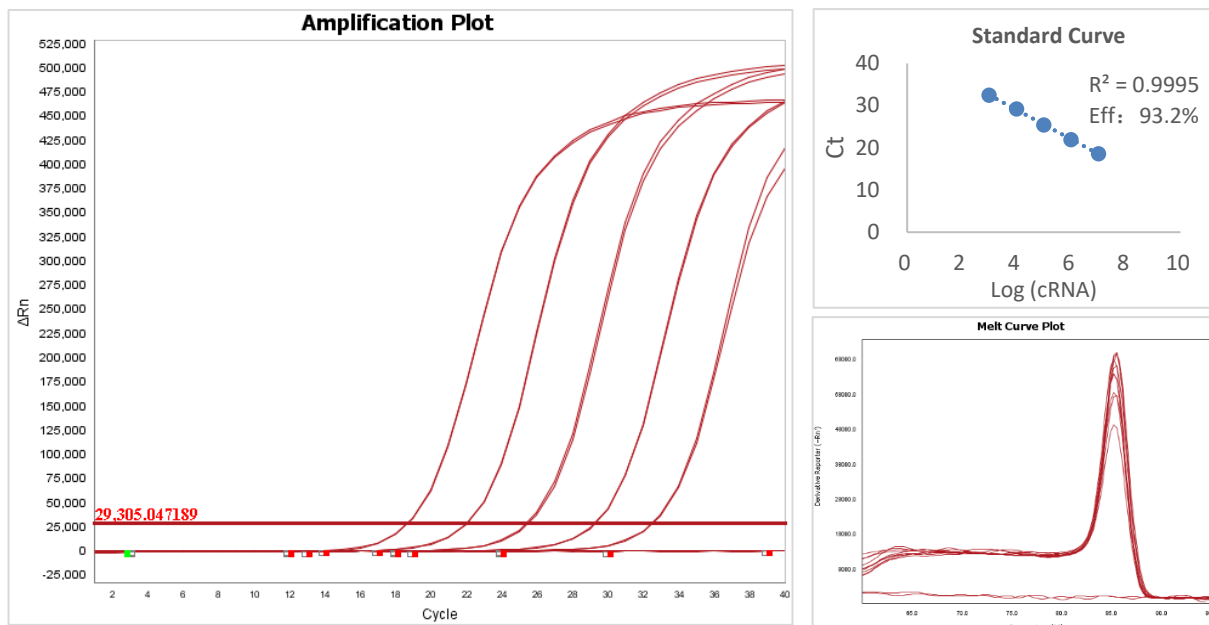


结果如上图: 1、工作曲线 $R^2=0.9990$, 扩增效率 103.2%。

2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量, 100 ng ~ 10 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. 采用本产品进行荧光定量检测小鼠 *GAPDH* (GC 含量为 56.1%) 基因, cDNA 模板添加量(相当于 Total RNA 量)为 10 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)。
- 结果如下:



结果如上图: 1、工作曲线 $R^2=0.9995$, 扩增效率 93.2%。

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、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: 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。可适当提高模板反应量。
- ❖ 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	
熔解曲线采集步骤		Dissociation stage	

*1: 此步骤进行荧光信号值采集。