

## 2X SYBR Green qPCR Master Mix

### 产品描述

定量 PCR (qPCR, 又称 Real-time PCR) 是一种非常通用的精确分析基因表达的技术。按方法不同可分为染料法和探针法两类, 其中染料法更通用、方便、成本更低。基于染料的 qPCR 法通过实时监测结合双链 DNA 的染料发射的荧光, 可以在 PCR 的每个周期间接测量 DNA 扩增。当在某一个时间点上, 检测到的荧光信号显著超过背景, 就可以确定 Ct 值 (Cq 值)。所获得的 Ct 值可用于评估目标基因的相对丰度, 也可根据适当的标准曲线计算获得绝对数量。

我们的产品 2X SYBR Green qPCR Master Mix 在定量目标 DNA 或 cDNA 方面具有优越的特异性、强劲的扩增效率、理想的可重复性和稳定性。它是一个 2X PreMix, 使用了结合抗体的热启动 Taq DNA 聚合酶。理想的 Taq 聚合酶和合适的缓冲液保证了较好的特异性和较高的扩增速度。Mix 中的 SYBR Green I 可嵌入双链 DNA 的双螺旋小沟区域, 当它与每个周期扩增的双链 DNA 结合时, 会发出绿色荧光, 通过仪器监测荧光可以实时的间接定量扩增产物。

该试剂与两种不同浓度的 ROX 染料一起提供, 用于对应的仪器, 用来校正仪器中不同反应之间的荧光信号强度。在进行实验时, 使用 SYBR<sup>®</sup>或 SYBR/FAM 模式。

然而, 染料法 qPCR 有一定的局限性。SYBR Green I 可以插入任何双链 DNA, 如引物二聚体或其他非特异性的产物, 导致非特异性产物发出荧光。为了确认产物的特异性, 在扩增后, 进行溶解曲线分析是必要的。在溶解曲线分析中, 在引物退火温度附近出现一个尖峰是较为理想的实验结果。

### 产品组分及储存条件

	5mL	25ml	50ml
<b>Components</b>	1000 rxn with 10 $\mu$ L reaction	5000 rxn with 10 $\mu$ L reaction	10000 rxn with 10 $\mu$ L reaction
	500 rxn with 20 $\mu$ L reaction	2500 rxn with 20 $\mu$ L reaction	5000 rxn with 20 $\mu$ L reaction
	200 rxn with 50 $\mu$ L reaction	1000 rxn with 50 $\mu$ L reaction	2000 rxn with 50 $\mu$ L reaction
<b>2X SYBR Green qPCR Master Mix</b>	1 ml $\times$ 5	1 ml $\times$ 25	5 ml $\times$ 10
<b>50X ROX Reference Dye (low concentration)</b>	0.2 ml	1 ml	1 ml $\times$ 2
<b>50X ROX Reference Dye (high concentration)</b>	0.2 ml	1 ml	1 ml $\times$ 2

将所有组分存放在  $-20^{\circ}\text{C}$  并避光保存。尽可能避免反复冻融。

## ROX染料选择

ROX 染料选择	qPCR 仪器
无需 ROX 染料	<b>Bio-Rad:</b> CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™, MiniOpticon™ <b>Cepheid:</b> SmartCycler® <b>Eppendorf:</b> Mastercycler® eprealplex, realplex 2s <b>Illumina:</b> Eco™ qPCR <b>Qiagen:</b> Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000 <b>Roche:</b> LightCycler® 480, 96, Nano, 1.5/2.0** <b>Thermo Scientific:</b> PikoReal Cyclor
使用 50X ROX Reference Dye (low concentration)	<b>Applied Biosystems:</b> 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio 6 and 7 Flex System, QuantStudio 3 and 5 <b>Agilent Stratagene:</b> MX4000™, MX3005P™, MX3000P™
使用 50X ROX Reference Dye (high concentration)	<b>Applied Biosystems:</b> 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne™, StepOne Plus™

## 实验操作

### 1. 建立qPCR反应体系

通过逆转录制备cDNA或通过DNA提取和纯化制备基因组DNA。

为了获得最佳结果，我们建议每个样品至少重复三次。

- 1) 将2X SYBR Green qPCR Master Mix、ROX染料、模板、引物在室温下解冻，然后放到冰上。完全解冻后，通过颠倒EP管或移液枪吹打使溶液分布均匀（如有必要进行离心以防止气泡）。
- 2) 根据反应的数量和每个反应的体积确定总体积，计算时注意超量10%，准备除对应模板外的所有组分的混合物。
- 3) 之后将混合物分入qPCR管或平板中。确保准确和一致的加样体积并尽量减少气泡。然后，添加模板。
- 4) 使用光学透明的盖子密封qPCR管，光学透明的黏性膜密封qPCR板。注意密封好qPCR板的边角，防止蒸发。
- 5) 充分混匀后，用离心机（几分钟，转速为2500-3000 rpm）将所有反应物离心到孔的底部，消除气泡（会干扰信号采集）。

#### \*Note:

- a. 使用不含模板的对照孔（No template control, NTC）来鉴定是否有污染。对照孔包含除模板外的所有反应组分（2X SYBR Green qPCR Master Mix、引物、无核酸酶水），此孔不应返回明显的 Ct 值。
- b. 使用稀释的 cDNA 或 DNA 作标准曲线，稀释应该在每次实验前准备。

qPCR反应体系如下表所示：（如果使用不同于表格中的反应体积，按比例缩放所有组分。不推荐使用小于10 μl的

反应体系)

Components	20 µl Reaction	50 µl Reaction	Final Concentration
2X SYBR Green qPCR Master Mix	10 µl	25 µl	1X
Forward Primer (10 µM)	0.5 µl	1.25 µl	0.25 µM
Reverse Primer (10 µM)	0.5 µl	1.25 µl	0.25 µM
Template DNA	Variable	Variable	1-100 ng
ROX Reference Dye	0.4 µl	1 µl	1X
Nuclease-free Water	Add to 20 µl	Add to 50 µl	

**\*Note:**

- 在大多数反应中，可以使用 0.25 µM 的最终引物浓度。当反应效能较差，可以在 0.2-1 µM 之间调整最佳引物浓度。
- 当直接使用逆转录产物作为模板时，其体积不应超过最终反应混合物的 10%。向反应体系中添加模板的数量取决于目标基因拷贝的数量。一般情况下，每个反应使用 1-10 ng 单链 cDNA 或 10-100 ng gDNA。可以采用梯度稀释法确定最佳模板加入量。cDNA 模板通常应包含目标基因的 <math>10^9</math> 个拷贝，以确保定量反应保持线性。对于低丰度目标，模板应适当增加。由于 qPCR 的敏感性高，模板数量的准确性将会对最终结果产生很大的影响。建议稀释模板以提高实验的可重复性。例如，当作为 qPCR 模板时，1 µg RNA 的逆转录产物（10 µl 逆转录系统）建议稀释 10 倍。
- 由于混合料中含有 SYBR Green I 染料，在制备反应混合物时应避免强光直射。

## 2. 启动qPCR反应

使用SYBR®或SYBR/FAM模式设置qPCR仪，确保在延伸步骤结束时采集荧光信号。首选两步法qPCR程序。如果出现了较差的结果，如非特异性扩增过多或扩增效率低等，可调整反应组分和条件或使用三步法qPCR程序。

### 1) 两步法qPCR程序:

Stage	Cycles	Procedure	Temperature	Time
Stage1: Hot-Start Taq Polymerase Activation	Hold(1 cycle)	Initial Denaturation	95°C	2 min
Stage2: PCR	CYCLE (40 cycles)	Denaturation	95°C	15 sec
		Annealing/Extension	60°C	30-60 sec
Stage3: Melt Curve	CYCLE (1 cycle)		95°C	15 sec
			60°C	60 sec
			95°C	15 sec

**\*Note:**

- 一般情况下预变性使用 95°C 下 2 分钟，热激活 DNA 聚合酶。对于 GC 含量较高的目标序列，可以适当延长预变性的时间。
- 延伸时间应根据实际使用的 PCR 仪所需的最小数据采集时间进行调整。

如：使用 ABI 7500 Fast / 7700 / 7900HT / 7900HT Fast / ViiA 7 / StepOne / StepOnePlus 时，将延伸时间设置为 30 秒；使用 ABI 7000 和 7300 时，将延伸时间设置为 31 秒；使用 ABI 7500 时，将延伸时间设置为 34 秒。

有些 qPCR 仪可以使用更短的延伸时间，如 ABI StepOnePlus™ 仅需要 10 秒，Roche LightCycler / LightCycler 480 需要 20 秒，你可以根据你的目标序列长度和仪器要求来调整延伸时间。

c. 不同的仪器类型需要不同的溶解曲线程序，按照实际使用的仪器确定溶解曲线程序。

## 2) 三步法 qPCR 程序:

Stage	Cycles	Procedure	Temperature	Time
Stage1: Hot-Start Taq Polymerase Activation	Hold(1 cycle)	Initial Denaturation	95°C	2 min
		Denaturation	95°C	15 sec
Stage2: PCR	CYCLE (40 cycles)	Annealing	50-60°C	30 sec
		Extension	72°C	30 sec
Stage3: Melt Curve	CYCLE (1 cycle)		95°C	15 sec
			60°C	60 sec
			95°C	15 sec

## ■ 注意事项

### 1. 引物设计

qPCR 实验设计的引物需要扩增效应好且非特异性产物少，可以遵循以下设计方针：

- 1) **目标序列长度**：80-200 bp 较为合适。可以根据实际要求延长到 300 bp，在这种情况下，建议延长延伸时间或使用三步法。
- 2) **引物长度**：17-30 bp。
- 3) **GC 含量**：40-60%（45-55% 较为理想）。
- 4) **Tm**：正向引物和反向引物的 Tm 值不能有显著差异，Tm 值可以用软件计算。
- 5) **引物序列**：A、T、C、G 分布最好较为均匀，避免 GC 或 AT 含量特别高的区域（特别是在 3' 端），避免聚嘧啶（T/C 连续结构）和聚嘌呤（A/G 连续结构）。
- 6) **3' 端序列**：引物的 3' 端 GC 和 AT 含量不能过高。我们建议选择在 3' 末端为 G 或 C 的序列（避免 3' 末端为 T）。3 个以上碱基的互补序列不能存在于引物中，也不能存在于引物对之间（分别造成发夹结构或引物二聚体）。引物对在每个 3' 端上不应该有多于两个碱基的互补序列，以避免引物二聚体。
- 7) **特异性**：通过软件确认引物的特异性。当设计引物时，在感兴趣的区域周围输入足够的序列。采用允许对相关序列数据库交叉参考的搜索标准（以避免潜在的扩增脱靶）。对于 cDNA 靶点，可以选择设计已知剪接位点的引物，以防止基因组 DNA 扩增。相反，针对内含子区域设计的引物可以确保只从基因组 DNA 进行扩增。

### 2. 模板制备及浓度

- 1) 长期储存时，为确保稳定性，模板 DNA 应储存在含 EDTA 的缓冲液（如 1X TE）中，用于 qPCR 实验的稀释后的溶液应新鲜配制，可使用 TE 或水稀释。

2) cDNA可以来源于起始为1 µg - 0.1 pg RNA逆转录反应产物。cDNA加入qPCR反应前可以不需要纯化，但由于过高的逆转录酶的浓度会抑制taq酶的活性，所以一般建议至少要1:10稀释，不过对于表达量极低的基因可以不稀释，此时模板加入量不可超过总体积的十分之一。

### 3. 反应条件和循环条件

- 1) 对于96孔板我们建议使用20 µl反应体积。384孔板建议10 µl的反应体积。
- 2) 在设置循环程序时，应确保在延伸步骤的末尾包含一个信号检测程序，并在最后进行溶解曲线分析，以确定产物的特异性。
- 3) 扩增40个循环对于大多数实验来说已经足够了，但是对于样本中拷贝量极低的目标基因，可以使用45个循环。

## 常见问题与解决方案

### 1. 在阴性对照中出现明显扩增

可能原因	解决方案
所用试剂或 Nuclease-free Water 被污染	使用新的试剂、Nuclease-free Water 和引物，在超净台上进行实验。避免在扩增后打开 qPCR 板（在新的 qPCR 检测中，以前扩增反应产物的气溶胶污染可能会导致各种问题）
引物二聚体	根据溶解曲线分析结果，阴性对照 35 个循环后出现轻微的扩增是正常的

### 2. Ct 值异常

可能原因	解决方案
扩增效率低	确保引物和模板没有降解。优化反应体系，如调整引物浓度、退火温度和时间。此外，尝试三步法或重新设计引物。对于 GC 含量高的模板，可以适当延长初始变性时间
模板浓度较低	增加模板浓度。如果使用稀释后的模板，降低稀释倍数，也可以采用梯度稀释来确定最佳的模板添加量
模板降解	使用新的模板
目标序列过长	一般情况下，靶片段长度在 80-200 bp 之间
反应体系中存在 PCR 抑制剂	尝试稀释或重新准备模板（可以重新纯化模板），因为抑制剂通常在模板中
Mg <sup>2+</sup> 浓度不够	对于某些 qPCR 反应，可能需要提高 Mg <sup>2+</sup> 的最终浓度。优化 Mg <sup>2+</sup> 终浓度时，建议每次增加 0.5 mM 浓度

### 3. 扩增曲线形状异常

可能原因	解决方案
扩增曲线不平滑	当信号过弱时，系统校准将会激活并导致此情况。在这种情况下，提高模板浓度
扩增曲线断裂或下滑	当模板浓度过高时，基线终点值高于 CT 值，降低基线终点值（Ct 值减 4）并重新分析数据

个别扩增曲线突然下降	反应管内有气泡，当温度升高时，气泡会突然破裂，导致曲线会突然下降。离心，并检查没有气泡存于反应体系中
------------	--

#### 4. 反应结束无扩增曲线出现

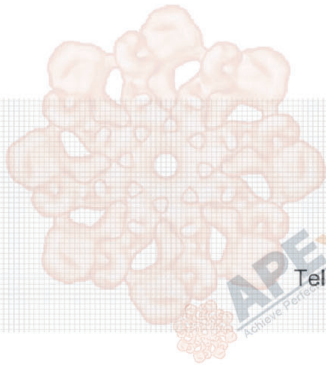
可能原因	解决方案
设置的循环次数不够	通常情况下，循环数设置为 40，但是应该注意的是太多的循环会增加背景，降低数据的可靠性
没有正确设置信号采集	在两步法中，信号检测应设置在退火和延伸阶段；对于三步法，信号检测应定位在 72°C 延伸阶段
引物降解	使用 PAGE 电泳确认引物的完整性，如果发生降解，则使用新的引物
模板浓度过低	如果模板被稀释，降低稀释率（对于表达水平未知的目标序列，建议首次不稀释使用模板）；如果模板没有稀释，重新制作模板样品或浓缩样品
模板降解	准备新的模板

#### 5. 熔解曲线出现多个峰

可能原因	解决方案
不合理的引物设计	引物二聚体或非特异扩增产物将导致熔解曲线出现多峰，应该重新设计引物，引物二聚体的峰通常出现在 75°C 左右
引物浓度过高	适当降低引物浓度
cDNA 中含有基因组 DNA 的污染	重新准备 cDNA 模板（提取 RNA 时使用 DNase）
较低的退火温度	提高退火温度
反应体积太小	不推荐反应体系低于 10 $\mu$ l，如果反应体积过小，检测精度会降低，建议提高反应体积

#### 6. 数据可重复性差

可能原因	解决方案
取样误差	使用较精确的移液枪很重要；可以采用较大的反应体系，或同时增大模板的稀释倍数和反应体积
模板浓度过低	减少模板稀释倍数或增加体积
样品纯度较低	重新提取或纯化样品
不同批次合成的引物之间的差异	尽可能使用相同的引物
仪器故障	仪器每个孔的温度或检测有误差，校准或修理仪器



**APEx BIO Technology**

[www.apexbt.com](http://www.apexbt.com)

7505 Fannin street, Suite 410, Houston, TX 77054.

Tel: +1-832-696-8203 | Fax: +1-832-641-3177 | Email: [info@apexbt.com](mailto:info@apexbt.com)

