

# 2× Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2 plus)操作说明

Cat. No.: A0012-R2

## 一、试剂盒简介

本试剂盒采用具有超强扩增能力和抗干扰能力的热启动 DNA 聚合酶，结合其高度优化的缓冲液体系和染料系统，使之具备更强的扩增效率、抗干扰能力，更高的灵敏度和特异性。在相同情况下具有起峰更早、得到的荧光信号更强、Ct 值更小及溶解曲线特异性更高等特点。

本试剂盒的 2× Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2 plus)预混了 ROX2 染料 (low ROX)，从而只需加入模板 cDNA、引物及 ddH<sub>2</sub>O，即可进行 qPCR 反应。同时，2× Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2 plus)中含有高稳定性的红色染料，可与 EZBioscience® Color Reverse Transcription Kit (Cat. No.: A0010C, A0010CG 或 A0010CGQ)一起使用，后者含有蓝色染料。在进行 qPCR 加样时，彩色逆转录试剂盒逆转录生成的 cDNA (蓝色)，与本试剂盒的 2× Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2 plus) (红色)混合后，溶液会变成紫色。这在加样时提供了很好的视觉辅助，大大降低了加样错误的风险。因此，建议将这两种试剂盒配套使用以获得最佳效果。

## 二、试剂保存条件

本试剂盒建议置于-20°C 避光保存。

## 三、适用的仪器型号 (如果仪器不在下表中，请使用 A0012-R1)

<b>ABI 7500, 7500 Fast, Quant-Studio 3, 5, 6, 7, 12K Flex, Dx, ViiA™7; Stratagene MX4000™, MX3000P™, MX3005P™.</b>
<b>Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; Roche LightCycler™ 96, Roche LightCycler™ 480; Eppendorf Mastercycler® ep realplex, realplex 2s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Thermo Scientific PikoReal Cyclyer; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®.</b>

## 四、简要操作步骤

1、使用前，将 2× Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2 plus)从-20°C 冰箱中取出，室温放置 5~10 分钟或用手紧握试剂管使之充分融化，上下颠倒 5~10 次充分混匀 (非常重要)，然后使用离心机短暂离心至管底，放在冰上备用。

2、逆转录反应得到的 cDNA 建议稀释并充分混匀后再作为模板使用，这样可以提高实验的重复性。通常建议稀释 5~10 倍后再使用 (具体的稀释倍数根据基因表达丰度来确定)。在 20 μl 的 qPCR 反应体系中：如果模板 cDNA 稀释 5 倍，建议使用 2 μl 的 cDNA (1~4 μl)；如果模板 cDNA 稀释 10 倍，建议使用 4 μl 的 cDNA (2~8 μl)；如果模板 cDNA 稀释 20 倍，建议使用 9.2 μl 的 cDNA；如果模板 cDNA 不稀释，建议使用 0.4 μl 的 cDNA (0.2~0.8 μl)。

假定模板 cDNA 在使用前已经用灭过菌的 ddH<sub>2</sub>O 稀释了 5 倍 (20 μl cDNA 加 80 μl ddH<sub>2</sub>O 稀释至 100 μl)，按照如下表格进行 qPCR 反应体系的配制：

成分	10 μl 体系	20 μl 体系
2× Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2 plus)	5 μl	10 μl
正向引物 (10 μM)	0.2 μl	0.4 μl
反向引物 (10 μM)	0.2 μl	0.4 μl
cDNA	1 μl (0.5~2 μl)	2 μl (1~4 μl)
ddH <sub>2</sub> O (灭过菌)	补足到 10 μl	补足到 20 μl

3、qPCR 加样体系的配制：为了使加样误差降低到最低，一般建议将 cDNA 和 ddH<sub>2</sub>O 配制成预混液，2× Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2 plus)和引物对配制成预混液，

分别混匀后再依次加入到每个反应孔中(例如,对于 20  $\mu$ l 的 qPCR 反应体系:每个反应孔中, cDNA 和 ddH<sub>2</sub>O 的预混液加 9.2  $\mu$ l, 2 $\times$  Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2 plus)和引物对的预混液加 10.8  $\mu$ l); 或者根据个人熟练掌握的加样方式进行加样。

4、加样完成后, 盖上封板膜并封紧, 用离心机 1000 rpm 离心 1 分钟, 将液体离心至 qPCR 孔板底部。

5、qPCR 反应程序如下:

Step	1	2	
	热启动酶活化 <sup>*1</sup>	PCR 反应	
		循环数 (40 cycles)	
		解链	退火&延伸 (采集荧光信号) <sup>*2</sup>
温度	95°C	95°C	60°C
时间	5 min	10 sec	30 sec
体积	10 $\mu$ l/ 20 $\mu$ l		

上述反应程序设置好后, 按照仪器默认的程序添加熔解曲线。

**注意:** <sup>\*1</sup>: 95°C 反应 5 分钟的目的是活化热启动酶, 该步骤为必须步骤, 因此不能省略;

<sup>\*2</sup>: 在退火&延伸这一步骤需要进行荧光信号的采集。

下方表格提供了一种代表性的熔解曲线程序供参考:

Step	1	2	3
加热或降温速度	100%	100%	1%
温度	95°C	60°C	95°C
时间	15 sec	1 min	30 sec
采集数据	-	-	升温阶段 采集荧光信号

## 五、关于 qPCR 反应是否良好的判断

1、如果扩增曲线呈典型的 S 型曲线, 荧光背景信号阶段、荧光信号指数扩增阶段及平台期均完整可见, 熔解曲线单峰, 内参 Ct 值在合理范围内 (通常可在 13 ~ 22 之间, 典型的内参 Ct 值在 15 ~ 20 之间), 则可认为该反应正常;

2、如果同一个模板和引物的重复孔的 Ct 值相差 0.5 以内;

同时满足以上两个条件的可以认为数据可用。

## 六、关于 qPCR 引物的设计

1、首先可以通过 Google Scholar 查询文献当中的引物, 通常中等及以上水平期刊中的 qPCR 引物绝大多数可以直接使用;

2、NCBI 数据库的 Blast 数据库中的 Primer Blast 提供了针对序列或者 Gene ID 的 qPCR 引物设计方案, 每个基因建议设计 2 对引物进行合成、验证;

3、Primer Bank 数据库中有部分已经验证过的引物可作为参考或者直接合成使用。

## 七、常见的注意事项、操作要点及优化方法

1、实验开始前首先验证引物是否适用, 标准与上述标准类似, 主要观察扩增曲线与熔解曲线;

2、引物验证好后应分装几份并放在 -20°C 保存, 以防止污染或降解;

3、RNA 及 cDNA 的质量均对 qPCR 的结果具有很大的影响, 因此应尽量保证 RNA 不降解, 通常建议 RNA 提取后尽快进行逆转录, 且避免反复冻融。如果预计使用量较大, 则可以一次多逆转几管 cDNA。如果不立即使用 cDNA, 则建议保存在 -80°C 冰箱。