

#J10001

SYBR Green qPCR Master

□ 500rxn (20 ul reaction)



Order 021-34695924
orders@ab-mart.com
Support 400-6123-828
support1@ab-mart.com
Web www.abmart.cn

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、更方便、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绝对数量。该产品 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。这是一个 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 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 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

Components	500 rxn (20 µl reaction)
2X SYBR Green qPCR Master Mix	1 mL x 5
50X ROX Reference Dye (low concentration)	0.2 mL
50X ROX Reference Dye (high concentration)	0.2 mL

将所有组分存放在-20℃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	Bio-Rad: CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™, MiniOpticon™ Cepheid: SmartCycler® Eppendorf: Mastercycler® eprealplex, realplex 2s Illumina: Eco™ qPCR Qiagen: Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000 Roche: LightCycler® 480, 96, Nano, 1.5/2.0** Thermo Scientific: PikoReal Cyclers
使用 50X ROX Reference Dye (low concentration)	Applied Biosystems: 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio 6 and 7 Flex System, QuantStudio 3 and 5 Agilent Stratagene: MX4000™, MX3005P™, MX3000P™
使用 50X ROX Reference Dye (high concentration)	Applied Biosystems: 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 μ l Reaction	50 μ l Reaction	Final Concentration
2X SYBR Green qPCR Master Mix	10ul	25ul	1 \times
Forward Primer (10 μ M)	0.5ul	1.25ul	0.25 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	0.5ul	1.25ul	0.25 μ M
Template DNA	Variable	Variable	1-100ng
ROX Reference Dye	0.4ul	1ul	1 \times
Nuclease-free Water	Add to 20 μ l	Add to 50 μ l	

*Note: a. 在大多数反应中，可以使用 0.25 μ M 的最终引物浓度。当反应效能较差，可以在 0.2-1 μ M 之间调整最佳引物浓度。 b. 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

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	95C°	2 min
Stage2: PCR	CYCLE (40 cycles)	Denaturation	95C°	15 sec
		Annealing/Extension	60C°	30-60 sec
Stage3: Melt Curve	CYCLE (1 cycle)		95C°	15 sec
			60C°	60 sec
			95C°	15 sec

*Note: a. 一般情况下预变性使用 95C° 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。 b. 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	95C°	2 min
Stage2: PCR	CYCLE (40 cycles)	Denaturation	95C°	15 sec
		Annealing	50- 60C°	30 sec
		Extension	72C°	30 sec
Stage3: Melt Curve	CYCLE (1 cycle)		95C°	15 sec
			60C°	60 sec
			95C°	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，但加入前至少要 1:10 稀释。 / 5 / www.apexbt.com

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 ²⁺ 浓度不够	对于某些 qPCR 反应，可能需要提高 Mg ²⁺ 的最终浓度。优化 Mg ²⁺ 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 μ 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