

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

Cat. No.: A0001-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。在相同的情况下具有起峰更早、得到的荧光信号更强、Ct 值更小及熔解曲线特异性更高等特点。此外，为了进一步简化操作，本试剂盒的 2× SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2 plus)预混了 ROX2 染料 (low ROX)，从而只需要将模板 cDNA、引物以及 ddH₂O 添加进去，即可进行 qPCR 反应。

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 A0001-R1)

ABI 7500, 7500 Fast, Quant-Studio 3, 5, 6, 7, 12K Flex, Dx, ViiA™7; Stratagene MX4000™, MX3000P™, MX3005P™.
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 Cycler; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®.

四、简要操作步骤

1、使用前，将 2× 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 ddH₂O 稀释了 5 倍 (20 μl cDNA 加 80 μl ddH₂O 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× 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 ₂ 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 ddH₂O 配制成预混液，2× 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 μl 的 qPCR 反应体系：每个反应孔中，cDNA 和 ddH₂O 的预混液加 9.2 μl，2× SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2 plus)和引物对的预混液加 10.8 μl)；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，然后用离心机 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 ^{*1}	PCR 反应	
		循环数 (40 cycles)	
		解链	退火&延伸 (采集荧光信号) ^{*2}
温度	95°C	95°C	60°C
时间	5 min	10 sec	30 sec
体积	10 µl/ 20 µl		

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： *1: 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；

*2: 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数据 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、引物验证好用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。