

货号: HR101

产品概述

本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 的专用预混试剂。产品是一种 2× 浓度的预混试剂, 含有进行 Real Time PCR 反应所需的适宜浓度的 SYBR Green I 和高浓度的 ROX Reference Dye 1; 产品采用了经过基因工程技术改造的化学修饰型 Hot Start DNA 聚合酶使之具有很强的扩增能力; 同时采用特别优化过的最佳缓冲液组分, 可以有效抑制非特异扩增、显著提高扩增效率, 特别适用于进行高灵敏度的 qPCR 反应。进行实验时, PCR 反应液的配制十分简单方便, 只需加入模板和引物, 再加水至指定体积混匀即可。使用本产品进行 qPCR 反应, 可以在宽广的定量区域内得到良好的扩增曲线, 对靶基因表达进行准确的定量检测, 重复性好, 可信度高。

产品组分

| 组分 | HR101-T (20 μl 体系/100 次) | HR101-S (20 μl 体系/500 次) | HR101 (20 μl 体系/2500 次) | HR101-L (20 μl 体系/5000 次) |
|--|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 2× Super SYBR Green qPCR Mix (with ROX1)*1 | 1 ml (1 ml × 1 管) | 5 ml (1 ml × 5 管) | 25 ml (1 ml × 25 管) | 50 ml (HR101 × 2) |

*1: 包含热启动 DNA 聚合酶、buffer、dNTPs、Mg²⁺、SYBR Green I、ROX1**储存条件**

本产品应 -20°C 避光保存, 使用过程中请尽量避免反复冻融。如每次使用量较少, 推荐分装成小份使用。

适用机型

本产品中包含用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差的高浓度 ROX Reference Dye 1, 适用于以下荧光定量 PCR 仪:

| |
|--|
| StepOne™, StepOne Plus™; ABI 7700, 7700, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; |
| Roche LightCycler™ 480; Cepheid SmartCycler®; Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; |
| Eppendorf Mastercycler® ep realplex, realplex 2 s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Thermo Scientific PikoReal Cycler. |

使用注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项, 使用前一定认真阅读。

- 1) 本产品中含有荧光染料 SYBR Green I 和 ROX Reference Dye 1, 配制 PCR 反应液时应避免强光照射。
- 2) 使用前, 请将 2× Super SYBR Green qPCR Mix 充分融化后, 上下轻轻颠倒充分混匀 (请勿使用振荡器振荡混匀), 避免产生气泡, 防止因混合不均匀造成的反应效果不佳, 混匀后可短暂离心将 Mix 收集至管底。
- 3) 配制反应液时, 试剂请于冰上放置。反应液的配制、分装请优先使用无酶的枪头、EP 管等, 尽量避免污染。
- 4) 尽量减少反复冻融次数, 以免产品性能下降。

实验前准备

- 1) 请做实验前准备好无酶或者已灭菌的枪头 (2.5 μl、20 μl、200 μl、1 ml)、无酶或者已灭菌的 EP 管、qPCR 板 (96 孔板或者 384 孔板或者八联管)、DEPC 水或者已灭菌的 ddH₂O。
- 2) 请提前预约好 qPCR 仪器, 然后根据预约好的时间安排好实验。

本产品仅用于研究, 请勿用于临床

操作步骤

1) 使用前, 将 2× Super SYBR Green qPCR Mix 试剂从 -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, 然后上下颠倒 5 ~ 10 次充分混匀 (很重要), 短暂离心至管底。

2) 一般逆转录反应得到的 cDNA 需要稀释 5 ~ 10 倍才可作为 qPCR 模板; 如果取用冻存的 cDNA 做模板, 则需将 cDNA 充分融化 (可用手捂或者室温放置 3 ~ 5 min), 然后上下颠倒 5 ~ 10 次充分混匀 (很重要), 短暂离心至管底后方可使用。

假定 cDNA 在使用前已经加水稀释 5 倍 (20 μl cDNA 加 80 μl ddH₂O 稀释至 100 μl, 并充分混匀, 很重要); 按照如下表格进行 qPCR 反应体系加样:

| 成分 | 10 μl 体系 | 20 μl 体系 |
|--|-------------------------------|-------------------------------|
| 总体积 | 10 | 20 |
| 2× Super SYBR Green qPCR Mix (with ROX1) | 5 | 10 |
| cDNA | 1 (可用 1 ~ 4 μl 稀释 5 倍后的 cDNA) | 2 (可用 2 ~ 8 μl 稀释 5 倍后的 cDNA) |
| 正向引物 (10 μM) | 0.2 | 0.4 |
| 反向引物 (10 μM) | 0.2 | 0.4 |
| ddH ₂ O | 补足到 10 | 补足到 20 |

3) 加样完成后, 如果使用的是 96 孔板或者 384 孔板, 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; 如果使用的是八联管, 则需将盖子用力盖紧, 并做上标记, 然后用离心机将液体离心至管底。

4) 按照下列 qPCR 反应程序进行扩增曲线的程序设置, 熔解曲线程序的设置通常按照仪器默认的程序进行, 无需修改。如下:

| Step | 1 | 2 | |
|------|---------------|-----------------|--------|
| | 热启动酶活化 | PCR 反应 | |
| | | 循环数 (40 cycles) | |
| | | 解链 | 退火&延伸 |
| 温度 | 95°C | 95°C | 60°C |
| 时间 | 5 min | 10 sec | 30 sec |
| 体积 | 20 μl / 50 μl | | |

注意: 95°C 反应 5 分钟的目的是活化热启动酶, 因此该步骤为必须步骤, 不能省略; 在退火&延伸这一步进行荧光信号的采集, 因此这一步荧光信号收集的图标应该点亮。

关于 qPCR 引物的设计

进行 Real Time PCR 反应时, 设计反应性能良好的 PCR 引物非常重要。根据以下原则, 可以设计 PCR 扩增效率高, 反应特异性强的良好引物。

- 1) PCR 扩增产物长度: 80 ~ 150 bp 较为合适 (可以延长至 300 bp);
- 2) 引物的最适长度为 17 ~ 25 bp;
- 3) 引物的 GC 含量为 40% ~ 60%, 最好为 45% ~ 55%;
- 4) 上游引物和下游引物的 T_m 值不能相差太大;
- 5) 引物 A、T、C、G 整体分布尽量均匀, 不要有部分的 GC rich 或者 AT rich, 尤其是在 3' 端; 避开 T/C 或 A/G 的连续结构;

- 6) 引物 3' 端碱基最好为 G 或者 C，尽量避免 3' 末端碱基为 T；
- 7) 避开引物内部或者两条引物之间有 3 个碱基以上的互补序列。两条引物间的 3' 末端避开有 2 个碱基以上的互补序列；
- 8) 使用 Blast 检索确认引物的特异性。

常见的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) 引物验证后应该分装为几份，防止污染或降解；
- 3) RNA 的质量及 cDNA 的质量对 qPCR 的结果具有很大的影响，应尽量保证 RNA 不降解，通常建议 RNA 提取后尽快进行逆转录，避免反复冻融或者多次逆转录。如果预计使用量较大，则可以一次多逆转几管 cDNA。建议将 cDNA 保存在 -80°C 冰箱。

数据分析

目标基因的表达通常采用相对定量法进行分析：

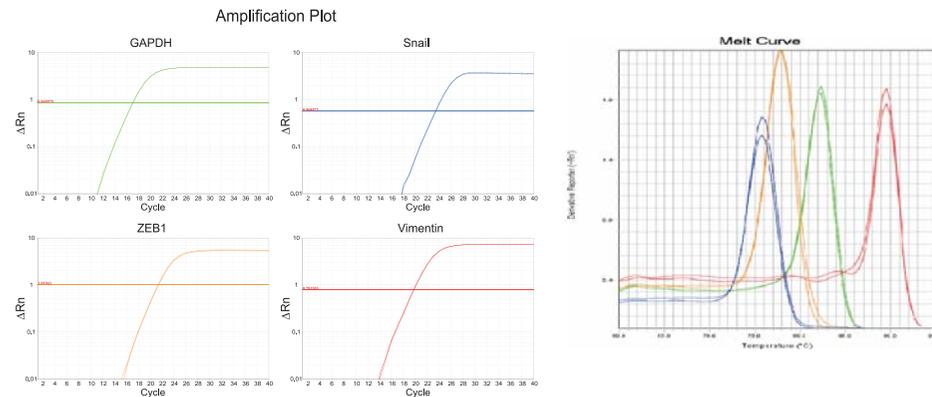
经过逆转录反应，得到与 mRNA 互补的 cDNA。可以用 cDNA 的量代表对应的 mRNA 的量，从而反映相应的基因表达水平。可以通过 qPCR 反应得到的 Ct 值与模板中 cDNA 的含量的数量关系来计算初始模板 cDNA 的含量。

首先根据检测的样品选定一个合适的（在各样品中的表达量较高并且比较稳定）基因，如 GAPDH 或 β -Actin 作为内参。

假设实验样品 T 中检测到目标基因 A 的 Ct 值为 Ct^{AT} ，内参基因 G 的 Ct 值为 Ct^{GT} ，二者的 $\Delta Ct^T = Ct^{AT} - Ct^{GT}$ 。在绝大多数的实验中，都应合理设立对照组（一般为未处理的细胞，健康的人或动物等）。假设对照组样品 C 中检测到目标基因 A 的 Ct 值为 Ct^{AC} ，内参基因 G 的 Ct 值为 Ct^{GC} ，二者的 $\Delta Ct^C = Ct^{AC} - Ct^{GC}$ 。

在分析实验组 T 相对于对照组 C 的目标基因 A 表达变化时，先用上面的两个差值相减，得到 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct^T - \Delta Ct^C$ 。在理想的情况下，PCR 扩增的效率是 100%，每经过一个循环，产物的量都是上一个循环结束时的 2 倍。这样，计算得到实验样品 T 中目标基因 A 的表达水平是对照组中的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 倍。

实验结果案例



上图为本试剂盒检测人肺癌细胞系 A549 中的内参基因 GAPDH，转录因子 Snail，ZEB1 及结构蛋白 Vimentin 等的基因表达的结果。由图可以看出，该试剂盒能够很好地检测各种不同丰度的基因的表达，具有良好的扩增能力、特异性和灵敏度。

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，初始阶段、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。

常见问题与解决方案

a. 熔解曲线出现双峰或多峰：

- 1) 引物设计不够优化：根据引物设计原则，重新设计合成新的引物。
- 2) 引物浓度太高：适当降低引物浓度。
- 3) cDNA 模板中有基因组污染：逆转录之前去除 RNA 中的基因组。

b. Ct 值太大：

- 1) 模板浓度太低：降低模板的稀释倍数，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- 2) 模板降解：重新制备模板，重复实验。
- 3) 扩增效率低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计引物。

c. 实验重复性差：

- 1) 加样体积不准：使用性能较好的移液枪；提高模板稀释倍数，以较大体积加入反应体系中；可以先将 Mix、水和引物按照需要的反应体系数量扩大 5% ~ 10%，混合之后分至各反应管中，以减少误差。

- 2) 模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差。减少模板稀释倍数或提高加样体积。

- 3) 定量 PCR 仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。

d. 反应结束无扩增曲线出现：

- 1) 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段；三步法扩增程序应当将信号采集设置在延伸阶段。
- 2) 引物降解或污染：溶解的引物应分装成小份，-20°C 冻存，减少冻融次数，并防止污染；
- 3) 引物设计有误或使用了错误的引物：核对引物序列，重新合成引物；使用正确的引物。
- 4) 模板浓度太低：降低模板的稀释倍数，一般未知浓度的样品先从最高浓度开始做起。
- 5) 模板降解：重新制备模板，重复实验。
- 6) PCR 产物太长：一般将 PCR 产物长度设计为 80 ~ 150 bp 之内。
- 7) 反应体系中存在 PCR 反应抑制剂：一般为加入模板时带入，提高模板稀释倍数或者重新制备模板。

e. 扩增曲线形状异常：

- 1) 扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，适当稀释后重复实验。
- 2) 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统矫正后产生。提高模板浓度重复实验。
- 3) 个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡，由于温度升高后气泡破裂，使仪器检测到的荧光值突然降低所致。处理样本时要注意离心、进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

f. 阴性对照也出现明显扩增：

- 1) 反应体系或者水被污染：更换新的 Mix、引物和水；如有必要可在超净工作台内配制反应体系，减少气溶胶污染。
- 2) 扩增出引物二聚体：核对引物序列，重新设计引物；降低引物浓度。若在 35 个循环以后阴性对照出现扩增属正常情况，可配合熔解曲线进行分析。