

2× Super SYBR Green qPCR Mix 使用说明书

货号：HR100

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× 浓度的试剂，含有进行 Real Time PCR 反应所需的适宜浓度的 SYBR Green I。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；同时采用了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、引物，最后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	HR100-T (20 μl 体系/100 次)	HR100-S (20 μl 体系/500 次)	HR100 (20 μl 体系/2500 次)	HR100-L (20 μl 体系/5000 次)
2× Super SYBR Green qPCR Mix	1 ml (1 ml × 1 管)	5 ml (1 ml × 5 管)	25 ml (1 ml × 25 管)	HR100 × 2

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

储存条件

本产品应-20℃ 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

本产品适用于不需要使用 ROX Reference Dye 的 qPCR 仪器，具体型号如下表所示：

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

如果所用的 qPCR 仪器需要添加 ROX Reference Dye，则请根据仪器型号选用货号为 HR101 (ROX1 预混型) 或 HR102 (ROX2 预混型) 的试剂。

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，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 5~10 次充分混匀（**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℃ 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	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，注意不能有气泡。

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℃	95℃	60℃
时间	5 min	10 sec	30 sec
体积	20 μl/ 50 μl		

注意：95℃ 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 富集或者 AT 富集，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溶解曲线;
- 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, 则可以一次多逆转录几管 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:

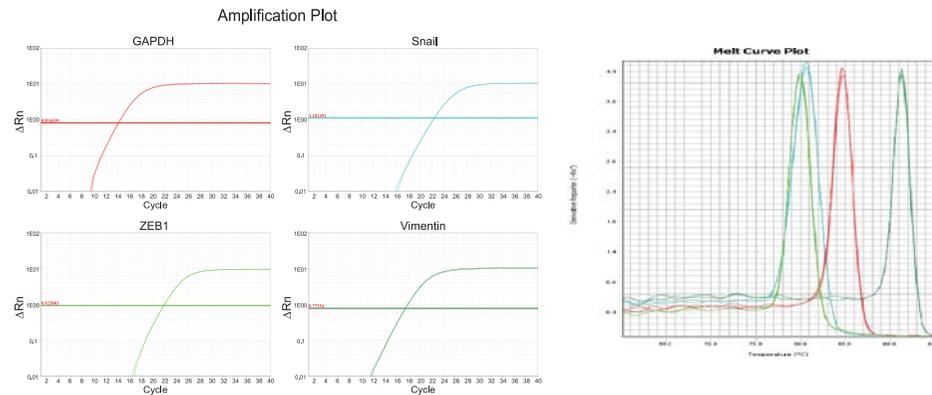
经过逆转录反应, 得到与 mRNA 互补的 cDNA。可以用 cDNA 的量代表对应的 mRNA 的量, 从而反映相应的基因表达水平。可以通过 qPCR 反应得到的 Ct 值与模板中 cDNA 的含量的数量关系来计算初始模板 cDNA 的含量。

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。

假设实验组样品 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



上图为使用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, 溶解曲线单峰, 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. 溶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, 可配合溶解曲线进行分析。