

## SYBR® Green qPCR Mix (with ROX)

Cat. #: P2091a, P2092a, P2093a

### 产品简介

SYBR® Green qPCR Mix 是 2X 浓缩的实时定量 PCR 预混液，使用时只需加入模板和引物即可进行反应。本品含有基于核酸适配子 (Aptamer) 的抑制剂，能够与 DNA 聚合酶可逆结合。当温度低于 45℃ 时与聚合酶结合抑制其活性，当温度达到 94℃ 时与聚合酶分离激活酶活性，从而可以减少引物二聚体和其他次级产物对反应的干扰。同时，本品中的 DNA 聚合酶是经过化学修饰的热启动版的 Taq DNA 聚合酶，在室温下活性被抑制，从而可以避免非特异性延伸。采用这种双重热启动机制可以显著提高定量 PCR 的特异性。本品配有进口参比染料 ROX，适用于需要 ROX 校正的定量 PCR 机型，如 ABI 等。

### 产品组成

Component	P2091a	P2092a	P2093a
2X SYBR® Green qPCR Mix <sup>a</sup>	1 ml	1 ml × 5	1 ml × 10
100X ROX Reference Dye <sup>*</sup>	40 µl	200 µl	400 µl
超纯水	1 ml	1 ml × 5	-

a 包含 SYBR® Green I, Hotstart Taq DNA 聚合酶, Aptamer, dNTP 及反应缓冲液等。

\* 所配 ROX 含量为最终反应体系的 2%，请根据需要调整用量。

### 保存条件

SYBR® Green qPCR Mix -20℃ 避光保存 2 年，4℃ 避光可短期保存。ROX 4℃ 避光可长期保存。

### 质量控制

纯度检测：经质量检测，产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测：经不同来源的模板和引物检测，产品具有优秀的特异性、灵敏性及可重复性等。

### 应用举例

#### 1. 配制反应体系

Component	Volume		Final concentration
DNA template <sup>[1]</sup>	0.5-2 µl	1-4 µl	Variable
Forward primer (10 µM) <sup>[2]</sup>	0.2 µl	0.4 µl	0.2 µM
Reverse primer (10 µM)	0.2 µl	0.4 µl	0.2 µM
2X SYBR® Green qPCR Mix <sup>[3]</sup>	5 µl	10 µl	1X
100X ROX Reference Dye <sup>[4]</sup>	Variable	Variable	Variable
ddH <sub>2</sub> O	Variable	Variable	-
Total volume <sup>[5]</sup>	10 µl	20 µl	-

[1] DNA 模板建议用量 (10-20 µl 体系)：1-10 ng cDNA，或 10-100 ng gDNA。加样体积不宜过小，以免造成较大的误差，但是 cDNA 的量不宜超过总体积的 1/10。因此模板建议浓度 (加样前)：cDNA 1-10 ng/µl，gDNA 10-100 ng/µl。

[2] 引物终浓度建议范围：0.2-0.6 µM。特异性差时可降低浓度，效率低时可提高浓度。

[3] 如果溶解曲线出现杂峰，可以减少 Mix 用量至 8 µl (20 µl 体系)；如果对痕量模板的检出率较低，可以增加 Mix 用量至 12 µl (20 µl 体系)。

[4] 对于某些固定型号的仪器，需要添加 ROX 才能精确测定 Ct 值。ROX 会给溶解曲线分析造成一定的背景干扰。因此，为了避免 ROX 的杂峰背景干扰，在应用软件的“Passive Reference Dye”中不要选择检测 ROX 荧光值选项，然后再进行数据的收集与分析。由于 ROX 的使用体积较小，建议将 ROX 提前与 qPCR Mix 混匀使用。ROX 用量参照具体仪器说明，下表仅供参考。

Instruments	ROX (100X)
ABI PRISM 7000/ PRISM 7700/ 7300/ 7900HT/ Step One/ Step One Plus/ GeneAmp 5700	1-2% (High ROX)
ABI 7500/ 7500 Fast/ ViiA 7/ QuantStudio 6/7/12K Flex; Agilent Stratagene Mx3000P/ Mx3005P/ Mx4000	0.2% (Low ROX)
Bio-Rad CFX96/ CFX384/ iQ/ iQ5; MJ Research Opticon 2/ Chromo 4; Roche LightCycler 480/ 96; Corbett Rotor Gene G/ Q/ 3000/ 6000; Thermo PikoReal 96; Eppendorf MasterCycler ep realplex; Cepheid Smart Cycler	No ROX

[5] 建议总体积不小于 10 µl，以免造成较大的加样误差。具体体积范围参考仪器说明。

#### 2. 设定反应程序进行 qPCR 反应

注：本品含有热启动酶，在 60℃ 时会抑制酶活性，因此**不建议使用两步法**，推荐使用经典三步法或极速三步法。

**经典三步法程序示例如下：**

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	94 °C	3 min	1
Denaturation	94 °C	<b>15 sec</b>	40
Annealing	55-65 °C <sup>[1]</sup>	<b>15 sec</b>	
Extension	72 °C	<b>20 sec</b>	
Dissociation/Melting curve analysis (optional) <sup>[3]</sup>			

**本品可用极速三步法快速完成反应，程序示例如下：**

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	94 °C	3 min	1
Denaturation	94 °C	<b>5 sec</b>	40
Annealing	55-65 °C <sup>[1]</sup>	<b>5 sec</b>	
Extension	72 °C	<b>5-10 sec<sup>[2]</sup></b>	
Dissociation/Melting curve analysis (optional) <sup>[3]</sup>			

[1] 最适退火温度需要摸索。退火温度一般设定为所用引物的 T<sub>m</sub>-5 °C，若低于 55 °C，则以 T<sub>m</sub> 值为退火温度，一般不低于 55 °C。

[2] 150 bp 以内的扩增子可设置为 5 sec；150-300 bp 的扩增子可设置为 10 sec；300 bp 以上的扩增子可适当延长时间。

[3] 不同仪器熔解曲线采集程序不同，一般按仪器默认熔解曲线采集程序即可。可在延伸（三步法）或退火延伸（两步法）阶段采集信号，也可在反应结束后 72 hrs 之内采集（避光低温保存）。

### 3. 分析结果

观察扩增曲线；调整基线，计算 Ct 值；观察熔解曲线检测特异性；进行相对或绝对定量。

#### 注意事项

- ① 使用前 Mix 需要完全解冻，充分混匀。尽量避免多次反复冻融。短期使用可避光保存于 4 °C。
- ② 将 (n+x) 份反应液混匀后再分注到 n 个单管中，可降低加样误差。（n 为重复次数，x 为损耗量，一般为 n 的 1/10）
- ③ ABI 的定量仪器大部分需要 ROX 校正管间差异，Bio-Rad 的定量仪器不需要 ROX 校正。具体仪器请参照其使用说明。
- ④ 轻轻混匀反应液，避免产生气泡，气泡会干扰荧光检测。可瞬时离心去除气泡。
- ⑤ 引物的特异性、用量以及退火温度是影响实验结果的重要因素。务必设计特异性好的引物，随实验结果适当调整引物用量（0.05-0.9 μM）——特异性较差时减少引物用量，或以 3 °C 为增量提高退火温度，扩增效率较低时增加引物用量。
- ⑥ DNA 模板的量应小于 500 ng/反应，过高的模板量会引起非特异性扩增。应根据模板类型与基因表达量适当调整用量。
- ⑦ 熔解曲线的采集不是必须的，初次使用的引物建议进行熔解曲线采集。熔解曲线可以看出产物的特异性。产物特异性不好的原因有：引物特异性低；退火温度设置偏低；引物/模板浓度偏高；等。同时，建议通过琼脂糖凝胶电泳检测产物的特异性。

#### 相关产品

名称	货号	规格
PCR Mix	P2011/P2012/P2013/P2014/P2015	1ml/5ml/10ml/50ml/100ml
Power Green qPCR Mix	P2101/P2102/P2103/P2104/P2105	1ml/5ml/10ml/50ml/100ml
1kb ladder	M1181/M1182	50 次/250 次
DS <sup>TM</sup> 5000	M1111/M1112	60 次/300 次
高纯度质粒小提试剂盒	N1011/N1012/N1013	50 次/100 次/200 次
通用 RNA 提取试剂盒	R1051	50 次
基因组 DNA 快速提取试剂盒	N1111/N1112	50 次/100 次
DNA 凝胶回收试剂盒	N1071/N1072/N1073	50 次/100 次/200 次
RT-PCR Kit	R1011/R1012	20 次/100 次

更多 PCR 酶、DNA Marker 及核酸提纯类产品请登录东盛生物官网查询。