

# 2× SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2)

## 说明书

Cat. No.: A0001-R2

### 一、产品简介

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) 预混了 ROX2 染料 (low ROX)，从而只需要将模板 cDNA、引物以及 ddH<sub>2</sub>O 添加进去，即可进行 qPCR 反应。

### 二、产品组分

组分	A0001-R2 (500 Rxns, 20 µl/Rxn)	A0001-R2-L (2500 Rxns, 20 µl/Rxn)
2× SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2) <sup>*1</sup>	5 ml	25 ml

注：\*1. 包含热启动 DNA 聚合酶，dNTPs, Mg<sup>2+</sup>, Buffer, 和 SYBR Green I 染料，且预混了低浓度 ROX 用于校正不同孔之间的荧光信号误差。

### 三、保存条件

本试剂盒建议置于 -20°C 避光保存，可保存 24 个月。

### 四、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 1, 3, 5, 6, 7, 12K Flex, Dx, ViiA™7; <b>Aligent</b> AriaMx, Stratagene MX4000™, MX3000P™, MX3005P™.
<b>Bio-Rad</b> CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; <b>Roche</b> LightCycler™ 96, Roche LightCycler™ 480; <b>Eppendorf</b> Mastercycler® ep realplex, realplex 2s; <b>Illumina</b> Eco qPCR; <b>Qiagen/Corbett</b> Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; <b>Thermo Scientific</b> PikoReal Cyclyer; <b>Analytikjena</b> qTOWER 3G; <b>Cepheid</b> SmartCycler®; <b>Bioer</b> Linegene 9600; <b>HONGSHI</b> SLAN®-96P.

### 五、注意事项

1. 实验开始前首先验证引物是否适用，参考此说明书第七项标准，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。

### 六、操作步骤

1. 使用前，将 2× SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2) 试剂从 -20°C 冰箱中取出，室温放置 5 ~ 10 min 或用手紧握试剂管使之充分融化，上下颠倒 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  $\mu$ l 的 qPCR 反应体系中：如果模板 cDNA 稀释 5 倍，建议使用 2  $\mu$ l 的 cDNA（1 ~ 4  $\mu$ l）；如果模板 cDNA 稀释 10 倍，建议使用 4  $\mu$ l 的 cDNA（2 ~ 8  $\mu$ l）；如果模板 cDNA 稀释 20 倍，建议使用 9.2  $\mu$ l 的 cDNA；如果模板 cDNA 不稀释，建议使用 0.4  $\mu$ l 的 cDNA（0.2 ~ 0.8  $\mu$ l）。

假定模板 cDNA 在使用前已经用灭过菌的 ddH<sub>2</sub>O 稀释了 5 倍（20  $\mu$ l cDNA 加 80  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 稀释至 100  $\mu$ l），按照如下表格进行 qPCR 反应体系的配制（为了使加样误差降低到最低，一般建议将 cDNA 和 ddH<sub>2</sub>O 配制成预混液，下表剩余组分配制成预混液，分别混匀后再依次加入到每个反应孔中；或者根据个人熟练掌握的加样方式进行加样）：

成分	10 $\mu$ l 体系	20 $\mu$ l 体系
2 $\times$ SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2)	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l
正向引物 (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l	0.4 $\mu$ l
反向引物 (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l	0.4 $\mu$ l
cDNA	1 $\mu$ l (0.5 ~ 2 $\mu$ l)	2 $\mu$ l (1 ~ 4 $\mu$ l)
ddH <sub>2</sub> O (灭过菌)	补足到 10 $\mu$ l	补足到 20 $\mu$ l

3. 加样完成后，盖上封板膜并封紧，用离心机 1000 rpm 离心 1 min，将液体离心至 qPCR 孔板底部。

4. 按照下列 qPCR 反应程序进行扩增曲线的程序设置，溶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。

Step	1	2		3
	热启动酶活化 <sup>*1</sup>	PCR 反应		溶解曲线
		循环数 (40 cycles)		仪器默认设置
		解链	退火&延伸 (采集荧光信号) <sup>*2</sup>	
温度	95°C	95°C	60°C	
时间	5 min	10 sec	30 sec	
体积	10 $\mu$ l/ 20 $\mu$ l			

**注意：** \*1. 95°C 反应 5 min 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。

## 七、关于 qPCR 反应是否良好的判断

① 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，溶解曲线单峰，内参 Ct 值在合理范围内（通常在 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 同一个模板和引物的重复孔的 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。