

2× EZ Color SYBR Green qPCR Master Mix

说明书

Cat. No.: CQ23

一、产品简介

本试剂盒是一款采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 反应的专用预混型试剂。产品使用了新型抗 Taq 抗体的 Hot Start 法 DNA 聚合酶，与高度优化的缓冲液体系和染料系统组合，可以有效抑制非特异性的 PCR 扩增，大大提高 PCR 的扩增效率。

本试剂盒预混了高稳定性的红色染料，可与 Color Reverse Transcription Kit (Cat. No.: A0010C, A0010CG 或 A0010CGQ)、Color All-in-one Reverse Transcription Kit (with DNase) (Cat. No.: RT3C, RT3CP) 一起使用，后者含有蓝色染料。在进行 qPCR 加样时，彩色逆转录试剂盒逆转录生成的 cDNA (蓝色)，与本试剂盒的 2× EZ Color SYBR Green qPCR Master Mix (红色) 混合后，溶液会变成紫色。这在加样时提供了很好的视觉辅助，大大降低了加样错误的风险。此外，产品含有 50× ROX Reference Dye 1 (ROX1) 和 50× ROX Reference Dye 2 (ROX2)，适用于所有 qPCR 仪器。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标准曲线，对靶基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。

二、产品组分

组分	CQ23 (500 Rxns, 20 µl/Rxn)	CQ23-L (2500 Rxns, 20 µl/Rxn)
2× EZ Color SYBR Green qPCR Master Mix ¹	5 ml	25 ml
50× ROX Reference Dye 1	220 µl	220 µl × 5 tubes
50× ROX Reference Dye 2	220 µl	220 µl × 5 tubes

注：1*. 包含抗 Taq 抗体的热启动 DNA 聚合酶、dNTPs、Mg²⁺、SYBR Green I 染料，Buffer 和红色染料等。

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 (请根据仪器型号选用不同的 ROX)

Do Not Use ROX	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 Cyclyer; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®; Bioer Linegene 9600; HONGSHI SLAN®-96P.
Use ROX1	ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOne Plus™.
Use ROX2	ABI 7500, 7500 Fast, Quant-Studio 3, 5, 6, 7, 12K Flex, Dx, ViiA™ 7; Stratagene MX4000™, MX3000P™, MX3005P™.

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。建议将cDNA保存在-80°C。

六、操作步骤

1. 使用前，将2×EZ Color SYBR Green qPCR Master Mix、ROX Reference Dye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 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（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，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 μl 体系	20 μl 体系
2×EZ Color SYBR Green qPCR Master Mix	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
ROX Reference Dye（50×，根据仪器型号选择）	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. 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，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。

Step	1	2		3
	热启动酶活化 ^{*1}	PCR反应		熔解曲线
		循环数（40 cycles）		仪器默认设置
		解链	退火&延伸（采集荧光信号） ^{*2}	
温度	95°C	95°C	60°C	
时间	30 sec	10 sec	30 sec	
体积	10 μl/ 20 μl			

注意： *1. 95°C反应30 sec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，熔解曲线单峰，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。