

2× EZ Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX1 plus)

说明书

Cat. No.: CQ21

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 (ROX1 plus) (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，本试剂盒预混了高浓度 ROX Reference Dye (ROX1)，操作更加简便。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	CQ21 (500 Rxns, 20 µl/Rxn)	CQ21-L (2500 Rxns, 20 µl/Rxn)
2× EZ Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX1 plus) *1	5 ml	25 ml

注：*1. 包含抗 Taq 抗体的热启动 DNA 聚合酶、dNTPs、Mg²⁺、SYBR Green I 染料，高浓度的 ROX Reference Dye (ROX1)，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

ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOne Plus™.
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 Cyclers; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®; Bioer Linegene 9600; HONGSHI 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 (ROX1 plus) 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 (ROX1 plus)	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
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。