

## 2× Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2)

### 说明书

**Cat. No.: A0016-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。在相同情况下具有起峰更早、荧光信号更强、Ct 值更小及熔解曲线特异性更高等特点。

本试剂盒的 2× Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2) 预混了 ROX2 染料 (low ROX)，仅需向当中加入模板 cDNA、引物及 ddH<sub>2</sub>O，即可进行 qPCR 反应。同时，2× Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2) 中含有高稳定性的红色染料，可与 **EZBioscience®** Color Reverse Transcription Kit (Cat. No.: A0010CGQ) 等一起使用，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× Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2) (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。因此，建议将这两类试剂盒配套使用以获得最佳效果。

#### 二、产品组分

| 组分                                            | A0016-R2<br>(500 Rxns, 20 µl/Rxn) | A0016-R2-L<br>(2500 Rxns, 20 µl/Rxn) |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| 2× Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2) *1 | 5 ml                              | 25 ml                                |

注：1\*. 包含热启动 DNA 聚合酶、dNTPs、Mg<sup>2+</sup>、低浓度 ROX、SYBR Green I 染料和红色染料等。

#### 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 (如果仪器不在下表中，请使用 A0016-R1)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ABI</b> 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

- 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。
- 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。
- 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× Color 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 μl 的 qPCR 反应体系中：如果模板 cDNA 稀释 5 倍，建议使用 5 μl 的 cDNA（2 ~ 9.2 μl）。

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 μl cDNA 加 80 μl ddH<sub>2</sub>O 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 ddH<sub>2</sub>O 配制成预混液，下表剩余组分分配成预混液，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× Color SYBR Green qPCR Master Mix (ROX2) | 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                                       | 2.5 μl<br>(1 ~ 4.6 μl) | 5 μl<br>(2 ~ 9.2 μl) |
| ddH <sub>2</sub> 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，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         |                             | 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） <sup>*2</sup> |        |
| 温度   | 95°C                 | 95°C           | 60°C                        |        |
| 时间   | 5 min                | 10 sec         | 30 sec                      |        |
| 体积   | 10 µl / 20 µl        |                |                             |        |

**注意：** <sup>\*1</sup> 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；<sup>\*2</sup> 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 10 ~ 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。