

riboENZYME 2× SYBR Green qPCR 预混液使用说明

RN: R11131.2

产品简介

SYBR Green I 是一种可以与双链 DNA 结合并发出荧光的染料，荧光强度与结合在双链 DNA 上的 SYBR Green I 染料的数量相关，故可通过检测荧光信号的强弱反映 PCR 反应过程中的双链 DNA 产物的量，对 PCR 产物的量进行实时定量检测。

本产品 riboENZYME 2× SYBR Green qPCR 预混液含有 qPCR 反应所需的热启动 DNA 聚合酶、合适浓度的 SYBR Green I、dNTPs 底物、阳离子等，只需加入模板、引物及适量的水即可配制成合适的 qPCR 反应体系，且优化的配方可以有效的保证扩增效率并减少非特异性扩增。

表 1 试剂盒组成内容

Reagent	C11096-1 (1 mL)	C11096-2 (5 mL)
2× SYBR Green Mix	1 mL × 1	1 mL × 5

运输保存

产品需低温运输。收到产品后，请于-20°C保存，可以稳定保存一年。

使用前须知

- 1) 为避免外界因素(包括酶，极端 pH 或者温度条件等)导致相关实验样品或试剂降解，所有操作请严格遵循 DNA 和 RNA 操作规程。
- 2) 实验过程中，样品及试剂应于冰上放置，使用完毕后请于-20°C以下避光保存。
- 3) 使用前请瞬时离心再开盖，以免试剂粘附于管壁或管盖上造成损失或污染。
- 4) 使用过程请佩戴一次性手套等防护用品。
- 5) 本试剂仅供科研使用。

实验材料准备

cDNA 或 DNA 模板

qPCR 引物

超纯水或灭菌双蒸水

实时定量 PCR 仪

适用于实时定量 PCR 检测的 PCR 管或 PCR 板及无核酸酶移液器吸头

实验方法

1. 冰上解冻 2× SYBR Green Mix、DNA 模板，引物室温解冻后备用；所有试剂在取液前需混匀后再取用。
2. qPCR 反应体系配制，适用于 96 孔 PCR 板的 20 μL qPCR 反应体系按表 2 进行配制，其它体系可按比例调整。

表 2 20 μL qPCR 反应体系配制表

试剂	体积	终浓度
2× SYBR Green Mix	10 μL	1×
DNA/cDNA	2 μL	
Forward Primer (5 μM)	0.8 μL	200 nM
Reverse Primer (5 μM)	0.8 μL	200 nM
ddH ₂ O	至 20 μL	

注：1) 正反向引物初始反应浓度推荐使用 200 nM，最佳浓度可以在 100 nM~500 nM 之间优化；

2) 本试剂盒不含 ROX 染料，如使用 ABI PRISM® 7000/7700/7900HT, 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 等需额外添加 ROX 染料作为校正荧光的仪器，需另行准备所需的 ROX 染料 (C00109)。不同仪器对 ROX 染料的用量需求不一，请根据 ROX 染料说明及仪器的使用说明进行添加；

3) cDNA 最高使用量不能超过 qPCR 反应体系的 1/10，对于表达丰度较高的基因，可将 cDNA 稀释后再进行 qPCR，稀释比例一般为 10~1000 倍之间，请根据具体的 Ct 值进行调整；若模板为基因组 DNA，一般一个反应使用 10 ng DNA 模板，可根据样品情况和检测结果进行调整。

3. qPCR 反应

使用两步法或三步法 qPCR 反应程序进行 qPCR 反应，程序设置分别见表 3 和表 4：

表 3 三步法反应程序设置

循环	步骤	温度	时间	内容
1×	预变性	95°C	10 分钟	Taq 酶激活
40×	变性	95°C	5~10 秒	PCR 模板变性
	退火	60°C	20 秒	退火
	延伸	72°C	10 秒	延伸 (收集信号)
1×	熔解曲线分析	70°C-95°C	-	熔解曲线分析

表 4 两步法反应程序设置

循环	步骤	温度	时间	内容
1×	预变性	95°C	10 分钟	Taq 酶激活
40×	变性	95°C	5~10 秒	PCR 模板变性
	退火延伸	60°C	20 秒或仪器最短信号收集时长	退火延伸 (收集信号)
1×	熔解曲线分析	70°C-95°C	-	熔解曲线分析

注：1) 建议引物扩增产物长度控制在 70~150 bp 以获得最佳的 qPCR 扩增效果；

2) 建议设计引物时将引物退火温度控制在 60±2°C，qPCR 反应的退火温度设置为 60°C；引物退火温度不在此范围的，可根据引物退火

温度的情况调整 qPCR 反应的退火温度，退火温度小于 60°C 的，建议使用三步法；

3) 部分仪器（如部分 ABI 系列仪器）需要较长的恒温时间方能收集信号，使用此类仪器时建议使用两步法，退火延伸时长设置为仪器收集信号所需的最短时间（一般为 30s~34s，依仪器不同而不同），其它对收集信号恒温时长要求未要求超过 20 秒的，两步法时可设置退火延伸时长为 20 秒；

4) 使用 SYBR Green I 染料法进行的 qPCR 检测反应需要在循环结束后立即进行熔解曲线分析，检测温度为 70°C~95°C，升温速率为 0.5°C/次，恒温时间为 5 秒/次，或使用仪器默认的熔解曲线分析程序即可。

相关产品

产品编号	产品名称
Variant ¹	gen/lnc/circDETECT RNA_qPCR_Primer
Variant ¹	Bulge-Loop microRNA Primer Set
C11027 ²	riboSCRIPT Reverse Transcription Kit
C00109 ²	ROX Reference Dye
C11030 ²	riboSCRIPT mRNA/lncRNA qRT-PCR Starter Kit
C10211 ²	Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Starter Kit
Variant ¹	miDETECT miRNA qRT-PCR Standard RNA

注：1. 根据 miRNA/mRNA/lncRNA/circRNA 不同编号不同；2. 有不同的规格及规格编号。

FAQ

1. qPCR 反应有非特异扩增怎么办？

在合理的 Ct 值范围内 (Ct 值 15~30) 出现熔解曲线有杂峰的现象, 建议做如下改进:

- 1) 尝试优化 qPCR 反应体系和反应条件 (使用两步法并控制退火延伸时间不超过 20 秒 (除非仪器收集时间限制不能设置为 20 秒), 提高退火温度、降低引物浓度); 需考虑平衡扩增特异性和扩增效率在可接受的范围内;
- 2) 确认 RNA 模板质量, 使用高质量高完整度的 RNA 模板;
- 3) 以上均不能解决杂峰现象时, 建议重新设计引物。

如果目的基因表达丰度很低 (Ct 值超过 30, 与内参基因的 Ct 值相差 15 以上), 处理同无扩增信号, 此时的熔解曲线不具参考意义。

2. 无扩增信号是不是引物质量问题或者 qPCR 试剂质量问题？

只要引物序列能够跟目的模板序列匹配上, 基本均可以扩增, 建议做如下改进或检测:

- 1) 使用合适的反应体系及程序, 对于 RT-qPCR 实验, 特别注意逆转录引物是否适合当前实验;
- 2) 确认参照基因的检测结果是否正常, 若正常基本可排除 qPCR 试剂异常问题;
- 3) 建议确认原始扩增信号的情况, 避免因校正荧光异常 (部分 qPCR 仪需要使用校正荧光进行信号分析) 而产生错误的 Ct 值和扩增曲线分析结果;
- 4) 使用阳性对照样品 (如对应 RNA 的过表达质粒、miRNA 标准品 (适用于茎环法和加尾法 miRNA 引物) 或 miRNA mimic (仅适用于茎环法 miRNA 引物)) 进行 qPCR 或 RT-qPCR 检测, 以确认是否是引物问题;
- 5) 对于 mRNA、lncRNA、circRNA 还可考虑重新设计引物进行尝试, 以避免引物扩增区域因特殊结构等导致不能有效扩增的情况;
- 6) 如若反应体系、程序和引物都没有问题, 很有可能是目的 RNA 在实验模型中表达丰度很低或不表达, 建议更换为其它样品或模型再进行相应基因的 qPCR 实验。

3. 无模板对照样品有信号是否是引物的问题？

需根据具体 Ct 值分析对样品扩增信号是否有影响 (譬如, 无模板对照样品相对于实验样品, Ct 值大很多 (譬如无模板对照样品比实验样品的 Ct 值大 5, 相当于无模板对照样品的扩增产物量只有样品的 1/32), 可以认为基本不影响样品的检测结果), 若有影响, 处理同引物非特异扩增。

4. qPCR 的设定程序中预变性 10 分钟时间太长, 是否可以缩短？

预变性主要目的为激活热启动酶, 需根据热启动酶的性质设置, 本试剂盒中的热启动酶需要预变性 10 分钟方能完全激活, 不能缩短。