

### 特点:

Tiosbio® 2x Kappa SYBR Green I qPCR Mix (with ROX) 是基于 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real-Time PCR 的 2x 浓度预混液。

该预混液包括热启动 DNA 聚合酶、反应 Buffer、dNTPs、SYBR Green I 等试剂，试验时仅需加入引物、模板、水。热启动 DNA 聚合酶高温加热前，anti-Taq 单克隆抗体与 Taq 酶结合，抑制 Taq 酶的聚合酶活性，从而抑制低温条件引物与模板 DNA 的非特异性杂交，或引物二聚体引起的非特异性扩增。Anti-Taq 单克隆抗体在 PCR 反应第一循环的变性步骤中已完全失活，不会阻碍之后的 Taq Polymerase 反应，大大提高了 PCR 反应的灵敏度及特异性。优化浓度的 SYBR Green I 荧光染料，特异性地掺入 DNA 双链后，荧光信号增强，而不掺入链中 SYBR Green I 染料分子荧光信号不变，从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步，荧光可以在退火或延伸阶段测定。

另外，本产品中还添加了 Tli RNaseH (耐热性 RNaseH)，以 cDNA 作为模板进行 PCR 反应时，可以很好地抑制由于 cDNA 中残存 mRNA 对 PCR 反应造成的阻害作用。适合于快速荧光定量扩增反应，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。

该产品适用的 PCR 仪包括 ABI PRISM7000/ 7700/7900HT, 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR, Stratagene 的 Mx 3000P 等。

### 包装量及储存条件:

TR0203-1 为 1mL，用量为 100 次 (20μL/次)；TR0203-5 为 5mL，用量为 500 次 (20μL/次)。

组份	TR0203-1	TR0203-1
2x Kappa SYBR Green I qPCR Mix (with ROX)	1mL	5x1mL
ROX Reference Dye (50x)	40μL	200μL
ROX Reference Dye II (50x)	40μL	200μL

长期保存，请置于 -20°C，有效期 24 个月。经常使用，可于 4°C 保存六个月。

### 注意事项:

1. 长期 -20°C 存放可能会产生白色或淡黄色的沉淀，可用手握缓慢溶解，于室温短时间避光放置，轻柔上下颠倒混匀，避免产生气泡，直至沉淀全部消失。沉淀会导致溶液成分不均匀，使用前务必充分混匀试剂，但请勿涡旋振荡混匀！

2. 配制反应液时，试剂请于冰上放置。反应液的配制、分装请务必使用新的（无污染）枪头、Microtube 等。本产品中含荧光染料 Sybrgreen，配制 PCR 反应液时应避免强光照射。

3. 本产品热启动酶是基于 anti-Taq 抗体，与化学修饰型热启动酶相比，无需较长时间的要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。PCR 反应前模板的预变性通常设定为 95°C、30 秒。另外，某些定量仪器为测定稳定的荧光，延伸时间需要大于 30 秒。扩增曲线散乱，或者各孔间差异较大时，请根据实例对延伸时间进行调整。

4. 如果两步法程序试验结果未达到预期时，才需要优化 PCR 反应条件。因引物 Tm 值较低，两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

### ROX Reference Dye 的选择:

ROX Reference Dye 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，如使用 Applied Biosystems 的 Real Time PCR 扩增仪进行实验，就需要 ROX Reference Dye 进行孔间校正。

需要使用 ROX Reference Dye 校正的仪器：Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 等。

需要使用 ROX Reference Dye II 校正的仪器：Applied Biosystems 7500 和 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) 等。

无需校正的仪器：Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (TP950/TP970/TP980/TP990)；Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (TP700/TP760)；Smart Cycler II System (Cepheid)；LightCycler/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics)；CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) 等。

## 操作实例:

### 1. Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR System

① 按下表配制 PCR 反应体系:

组分	体积 (μL)	终浓度
2× Kappa SYBR Green I qPCR Mix (with ROX)	10	1×
PCR Forward Primer (10μM) *	0.4-0.8	0.2~0.4μM
PCR Reverse Primer (10μM) *	0.4-0.8	0.2~0.4μM
模板**	0.5~2μL	
ROX Reference Dye (50×) 或 ROX Reference Dye II (50×) ***	0.4μL	
ddH <sub>2</sub> O	至总体积 20	

\*引物终浓度为 0.2 μM 即可得到较好的试验结果, 反应性能较差时, 可在 0.1~1.0 μM 范围内进行调整。

\*\* 20 μL 反应体系中, 一般添加 10~100 ng 基因组 DNA, 或 1~10 ng cDNA。模板中目的基因的拷贝数可能存在较大差异, 可对模板进行梯度稀释, 以确定最佳的模板使用量。另外, 两步法中如以 cDNA (第一链 cDNA 合成反应产物) 作为模板时, 第一链 cDNA 合成反应产物的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

\*\*\*ROX Reference Dye II (50×) 比 ROX Reference Dye (50×) 浓度低, 使用 7500 /7500 Fast Real-Time PCR System 时, 请使用 ROX Reference Dye II (50×)。使用 ABI PRISM 7300 Real-Time PCR System 和 StepOnePlus 时, 请使用 ROX Reference Dye (50×)。

② 荧光定量 PCR 反应

#### Applied Biosystems 7300/7500 和 StepOne Plus Real-Time PCR System

按照两步法设置 PCR 程序。扩增速度约为 10~15sec/kb DNA, 物种、目的基因及扩增引物对 PCR 反应条件略有影响。每个反应的具体运行程序根据试验情况进行调整。

循环	温度	时间
1st Cycle	95°C	30sec
40 Cycles	95°C	15sec
	60°C	30~34sec*
Melting curve analysis		
Hold	4°C	Forever

\*StepOnePlus 设定时间为 30 秒; 7300 设定时间为 31 秒; 7500 设定时间为 34 秒。

反应结束后确认 Real-Time PCR 的扩增曲线、融解曲线和标准曲线。

#### Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System

按照两步法设置 PCR 程序。扩增速度约为 10~15sec/kb DNA, 物种、目的基因及扩增引物对 PCR 反应条件略有影响。每个反应的具体运行程序根据试验情况进行调整。

循环	温度	时间
1st Cycle	95°C	30sec
40 Cycles	95°C	3sec
	60°C	30sec
Melting curve analysis		
Hold	4°C	Forever

③ 标准曲线制作和结果分析

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线, 进行 PCR 定量时制作标准曲线等。分析方法参见仪器的操作手册。

### 2. LightCycler/LightCycler480 System

① 按下表配制 PCR 反应体系:

组分	体积 (μL)	终浓度
2× Kappa SYBR Green I qPCR Mix (with ROX)	10	1×
PCR Forward Primer (10μM) *	0.4~0.8	0.2~0.4μM
PCR Reverse Primer (10μM) *	0.4~0.8	0.2~0.4μM
模板**	0.5~2	
ddH <sub>2</sub> O	至总体积 20	

\*引物终浓度为 0.2μM 即可得到较好的试验结果，反应性能较差时，可在 0.1~1.0 μM 范围内进行调整。

\*\* 20μL 反应体系中，一般添加 10~100 ng 基因组 DNA，或 1~10 ng cDNA。模板中目的基因的拷贝数可能存在较大差异，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。另外，两步法中如以 cDNA（第一链 cDNA 合成反应产物）作为模板时，第一链 cDNA 合成反应产物的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

### ② 荧光定量 PCR 反应

#### LightCycler

按照两步法设置 PCR 程序。扩增速度约为 10~15sec/kb DNA，物种、目的基因及扩增引物对 PCR 反应条件略有影响。每个反应的具体运行程序根据试验情况进行调整。

PCR 反应用毛细管请用离心机轻轻离心后放入 LightCycler 中进行荧光定量 PCR 反应。

建议采用以下的两步法 PCR 反应程序，若该程序未满足需要的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化。因使用 Tm 值较低的引物，两步法 PCR 反应试验结果未达到预期时，可尝试三步法 PCR 扩增反应。

循环	温度	时间	变温速率
1st Cycle	95°C	30sec	20°C/sec
40 Cycles	95°C	5sec	20°C/sec
	60°C	20sec*	20°C/sec
Melting curve analysis	95°C	0sec	20°C/sec
	65°C	15sec	20°C/sec
	95°C	0sec	0.1°C/sec
Hold	4°C	Forever	

反应结束后确认 Real-Time PCR 的扩增曲线、融解曲线和标准曲线。

#### LightCycler 480 System

按照两步法设置 PCR 程序。扩增速度约为 10~15sec/kb DNA，物种、目的基因及扩增引物对 PCR 反应条件略有影响。每个反应的具体运行程序根据试验情况进行调整。

建议采用以下的两步法 PCR 反应程序，若该程序未满足需要的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化。因使用 Tm 值较低的引物，两步法 PCR 反应试验结果未达到预期时，可尝试三步法 PCR 扩增反应。

循环	温度	时间	变温速率
1st Cycle	95°C	30sec	4.4°C/sec
40 Cycles	95°C	5sec	4.4°C/sec
	60°C	30sec	2.2°C/sec
Melting curve analysis	95°C	5sec	4.4°C/sec
	65°C	60sec	2.2°C/sec
	95°C		0.11°C/sec
Cooling	50°C	30sec	2.2°C/sec
Hold	4°C	Forever	

反应结束后确认 Real-Time PCR 的扩增曲线、融解曲线和标准曲线。

### ③ 标准曲线制作和结果分析

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。分析方法参见仪器的操作手册。

### 3.Smart Cyclor II System

①按下表配制 PCR 反应体系:

组分	体积 (μL)	终浓度
2× Kappa SYBR Green I qPCR Mix (with ROX)	10	1×
PCR Forward Primer (10μM) *	0.4~0.8	0.2~0.4μM
PCR Reverse Primer (10μM) *	0.4~0.8	0.2~0.4μM
模板**	0.5~2	
ddH <sub>2</sub> O	至总体积 20	

\*引物终浓度为 0.2μM 即可得到较好的试验结果, 反应性能较差时, 可在 0.1~1.0 μM 范围内进行调整。

\*\* 20μL 反应体系中, 一般添加 10~100 ng 基因组 DNA, 或 1~10 ng cDNA。模板中目的基因的拷贝数可能存在较大差异, 可对模板进行梯度稀释, 以确定最佳的模板使用量。另外, 两步法中如以 cDNA (第一链 cDNA 合成反应产物) 作为模板时, 第一链 cDNA 合成反应产物的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

②荧光定量 PCR 反应

PCR 反应用毛细管请用离心机轻轻离心后放入 Smart Cyclor 中进行荧光定量 PCR 反应。建议采用以下的两步法 PCR 反应程序, 若该程序未满足需要的实验结果时, 再进行 PCR 条件的优化。因使用 T<sub>m</sub> 值较低的引物, 两步法 PCR 反应试验结果未达到预期时, 可尝试三步法 PCR 扩增反应。

循环	温度	时间
1st Cycle	95℃	30sec
40 Cycles	95℃	5sec
	60℃	20sec
Melting curve analysis		
Hold	4℃	Forever

反应结束后确认 Real-Time PCR 的扩增曲线、融解曲线和标准曲线。

### 4.SCFX96 Real-Time PCR Detection System

①按下表配制 PCR 反应体系:

组分	体积 (μL)	终浓度
2× Kappa SYBR Green I qPCR Mix (with ROX)	10	1×
PCR Forward Primer (10μM) *	0.4~0.8	0.2~0.4μM
PCR Reverse Primer (10μM) *	0.4~0.8	0.2~0.4μM
模板**	0.5~2	
ddH <sub>2</sub> O	至总体积 20	

\*引物终浓度为 0.2μM 即可得到较好的试验结果, 反应性能较差时, 可在 0.1~1.0 μM 范围内进行调整。

\*\* 20μL 反应体系中, 一般添加 10~100 ng 基因组 DNA, 或 1~10 ng cDNA。模板中目的基因的拷贝数可能存在较大差异, 可对模板进行梯度稀释, 以确定最佳的模板使用量。另外, 两步法中如以 cDNA (第一链 cDNA 合成反应产物) 作为模板时, 第一链 cDNA 合成反应产物的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

②荧光定量 PCR 反应

PCR 反应用毛细管请用离心机轻轻离心后放入 Smart Cyclor 中进行荧光定量 PCR 反应。建议采用以下的两步法 PCR 反应程序, 若该程序未满足需要的实验结果时, 再进行 PCR 条件的优化。因使用 T<sub>m</sub> 值较低的引物, 两步法 PCR 反应试验结果未达到预期时, 可尝试三步法 PCR 扩增反应。

循环	温度	时间
1st Cycle	95℃	30sec
40 Cycles	95℃	5sec
	60℃	30sec
Melting curve analysis		
Hold	4℃	Forever

反应结束后确认 Real-Time PCR 的扩增曲线、融解曲线和标准曲线。

## 5. Thermal Cycler Dice Real Time System III and Lite

①按下表配制 PCR 反应体系:

组分	体积 (μL)	终浓度
2× Kappa SYBR Green I qPCR Mix (with ROX)	10	1×
PCR Forward Primer (10μM) *	0.4~0.8	0.2~0.4μM
PCR Reverse Primer (10μM) *	0.4~0.8	0.2~0.4μM
模板**	0.5~2	
ddH <sub>2</sub> O	至总体积 20	

\*引物终浓度为 0.2μM 即可得到较好的试验结果, 反应性能较差时, 可在 0.1~1.0 μM 范围内进行调整。

\*\* 20μL 反应体系中, 一般添加 10~100 ng 基因组 DNA, 或 1~10 ng cDNA。模板中目的基因的拷贝数可能存在较大差异, 可对模板进行梯度稀释, 以确定最佳的模板使用量。另外, 两步法中如以 cDNA (第一链 cDNA 合成反应产物) 作为模板时, 第一链 cDNA 合成反应产物的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

②荧光定量 PCR 反应

PCR 反应用毛细管请用离心机轻轻离心后放入 Smart Cycler 中进行荧光定量 PCR 反应。建议采用以下的两步法 PCR 反应程序, 若该程序未满足需要的实验结果时, 再进行 PCR 条件的优化。因使用 T<sub>m</sub> 值较低的引物, 两步法 PCR 反应试验结果未达到预期时, 可尝试三步法 PCR 扩增反应。

循环	温度	时间
1st Cycle	95℃	30sec
40 Cycles	95℃	5sec
	60℃	30sec
Melting curve analysis		
Hold	4℃	Forever

反应结束后确认 Real-Time PCR 的扩增曲线、融解曲线和标准曲线。

### 试验条件的优化:

完美试验参数应该符合① 反应特异性高: 阴性对照无引物二聚体等残留; 无非特异性扩增; ②扩增效率高: 扩增产物起峰更早 (C<sub>t</sub> 值小); PCR 扩增效率高 (接近理论值 100%)。

如果按照推荐的两步法条件进行反应, 反应性能不好时, 请按照下面的方法进行引物和 PCR 反应条件的优化。

1.降低 Primer 浓度有助于提高特异性; 提高 Primer 浓度有助于提高扩增效率。

2.提高退火温度有助于提高扩增反应特异性; 增加延伸时间或将扩增程序变更为 3 步法有助于提高扩增效率。

3.95℃ 30 秒的预变性条件可使环状质粒 DNA 和基因组 DNA 模板变性, 如模板较为复杂, 变性时间可延长至 1~2 分钟。但是变性时间过长, 易致酶失活, 不推荐变性时间 > 2 分钟。