

## 产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2
		5 mL	25 mL
Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (No ROX) *	RM21204	5 × 1 mL	25 × 1 mL
50X ROX Dye I	RM21465	220 μL	5 × 220 μL
50X ROX Dye II	RM21466	220 μL	5 × 220 μL

\*注: 包含 ABclonal Genious Hot-Start Taq DNA 聚合酶、Mg<sup>2+</sup>、dNTPs、SYBR® Green I 等。

## 产品说明

ABclonal Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix 是采用 SYBR® Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 反应的专用试剂。本产品通过对 SYBR®/FAM 通道进行荧光信号定量检测, 获得 PCR 过程中 DNA 扩增的真实数据。本产品采用抗体法热启动 Taq DNA 聚合酶进行扩增, 在保证扩增效果的同时极大地提高了特异性。

ABclonal Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix 为 2X 浓度预混液, 除引物和模板外包含了所有 qPCR 反应所需成分, 为实验操作提供了极大的便利。

## 保存条件

-20°C 避光保存

## 适用机型

ROX 类型 *	qPCR 仪器
无需 ROX 参比染料	Bio-Rad iCycler 系列、Roche Light Cycler
50X ROX Dye I (High ROX)	ABI 7000/7300/7700/7900、ABI StepOne/StepOnePlus 等
50X ROX Dye II (Low ROX)	ABI 7500, ABI ViiA™7、ABI QuantaStudio 系列、Stratagene 系列、Corbett Rotor Gene 3000 等

\*注: 不同仪器所需 ROX Dye 不同, 请参考上述机型。

## 实验准备

1. 相应 EP 管、PCR 管、移液器和枪头、冰盒或冰。
2. qPCR 引物和相应模板。
3. qPCR 专用平板及密封光学薄膜。

## 注意事项

1. Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix 在使用前请充分融解, 避免强光直射, 并注意避光保存。
2. Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix 中含有甘油, 在使用前请轻轻混匀, 避免产生气泡; 取用前应混匀并离心。使用后立即放回 -20°C 冰箱保存。
3. 本产品含有聚合酶, 使用时请置于冰上, 短时间内多次使用可在 4°C 暂存, 应尽量避免反复冻融。

## 操作方法

### 实验前准备

1. 扩增产物的长度建议选择 70-200 bp 范围内。
2. 建议 20 μL 反应体系中加入 1 pg-50 ng 的 DNA 为模板, 并设置 NTC (无模板对照)。
3. 为确保实验结果的准确性, 建议每个样品和对照组重复 3 次。

## 实验方法

### 1. 配制 qPCR 反应体系

组分	加入量
Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (No ROX)	10 $\mu$ L
DNA 模板 *	2 $\mu$ L
正向引物 (10 $\mu$ M) **	0.4 $\mu$ L
反向引物 (10 $\mu$ M) **	0.4 $\mu$ L
ROX I / II (如需添加, 根据机型选择)	0.4 $\mu$ L
dd H <sub>2</sub> O	to 20 $\mu$ L

\*注: 以 10-100 ng 基因组 DNA, 或 1-10 ng cDNA 为模板参照量, 因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同, 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 RT-qPCR 反应的 cDNA (RT 反应液) 作为模板时, 添加量不要超过 qPCR 反应液总体积的 10%。

\*\*注: 通常引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 时可以得到较好的结果, 可以终浓度 0.1-1.0  $\mu$ M 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下, 可提高引物的浓度; 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度, 并优化反应体系。

### 2. 设置 qPCR 反应程序:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}$ C	3 min	1
循环反应	95 $^{\circ}$ C	5 s	40-45
	60 $^{\circ}$ C	30-34 s *	
熔解曲线		仪器默认设置	

\*注: 确保延伸后进行信号采集。延伸时间根据 qPCR 仪所需数据采集时间自行调整: 使用 StepOnePlus 请设定为 30 s; 使用 7300 请设定为 31 s; 使用 7500 请设定为 34 s。

## 数据分析

- 根据 Ct 值和样品投入量绘制标准曲线。标准曲线相关系数( $R^2$ ) > 0.98, 标准曲线斜率介于 -3 至 -3.5 之间, PCR 扩增效率(E)一般介于 90-120%之间。
- 重复管之间 Ct 值的 STD < 0.2, 不同批次间同一实验的 Ct 值的 STD < 0.5 (不同批次同一实验对比需保证阈值设置基本一致)。
- 扩增产物的熔解曲线无明显非特异性扩增产物(杂峰)或引物二聚体杂峰(必要时请进行琼脂糖电泳确认), 并且熔解曲线的 T<sub>m</sub> 值一般在 80-95 $^{\circ}$ C 之间。
- 有效 Ct 的确认: 有效的扩增的 Ct 值应小于无模板对照曲线的 Ct 值, 并且其熔解曲线无杂峰。