

## Power Green qPCR Mix (Low ROX+)

货号: P2101a, P2102a, P2103a

### 产品简介

Power Green qPCR Mix (Low ROX+) 是 2×浓缩的实时定量 PCR 预混液, 使用时只需加入模板和引物即可进行反应。本品中的 DNA 聚合酶是新一代抗体技术修饰的 Hotstart Taq DNA 聚合酶, 在室温下活性被完全抑制, 从而可以在室温下配置反应液。采用这种热启动机制可以显著提高定量 PCR 的特异性、扩增效率, 得到更广的可定量扩增区域。本品采用了新的增强剂, 对各种目的片段 PCR 效率的波动可控制在最小范围内, 反复冻融对扩增性能影响极小。本品预混了进口参比染料 ROX, 适用于需要低浓度 ROX 校正的定量 PCR 机型, 如 ABI 7500 等。

### 产品组成

| Component  | P2101a<br>(100 rxn/20µl<br>reaction) | P2102a<br>(500 rxn/20µl<br>reaction) | P2103a<br>(1,000 rxn/20µl<br>reaction) |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| 2X Power Green qPCR Mix<br>(Low ROX+) <sup>a</sup> | 1 ml                                 | 1 ml × 5                             | 1 ml × 10                              |
| 超纯水  | 1 ml                                 | 1 ml × 5                             | -                                      |

a 包含 SYBR<sup>®</sup> Green I, Hotstart Taq DNA 聚合酶, Aptamer, dNTP, ROX Reference Dye 及反应缓冲液等。

### 保存条件

Power Green qPCR Mix (Low ROX+) -20℃避光保存 2 年, 4℃避光可短期保存。

### 质量控制

纯度检测: 经质量检测, 产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测: 经不同来源的模板和引物检测, 产品具有优秀的特异性、灵敏性及可重复性等。

### 应用举例

#### 1. 配制反应体系 (以 ABI 7500 为例)

| Component   | Volume            | Final concentration |
|---|-------------------|---------------------|
| DNA template <sup>[1]</sup>                       | 0.5-2 µl 1-4 µl   | Variable            |
| Forward primer (10 µM) <sup>[2]</sup>             | 0.2 µl 0.4 µl     | 0.2 µM              |
| Reverse primer (10 µM)                            | 0.2 µl 0.4 µl     | 0.2 µM              |
| 2X Power Green qPCR Mix (Low ROX+) <sup>[3]</sup> | 5 µl 10 µl        | 1X                  |
| ddH <sub>2</sub> O                                | Variable Variable | -                   |
| Total volume <sup>[4]</sup>                       | 10 µl 20 µl       | -                   |

[1] DNA 模板建议用量 (10-20 µl 体系): 1-10 ng cDNA, 或 10-100 ng gDNA。加样体积不宜过小, 以免造成较大的误差, 但是 cDNA 的量不宜超过总体积的 1/10。

[2] 引物终浓度建议范围: 0.2-0.6 µM。特异性差时可降低浓度, 效率低时可提高浓度。

[3] 如果溶解曲线出现杂峰, 可以减少 Mix 用量至 8 µl (20 µl 体系); 如果对痕量模板的检出率较低, 可以增加 Mix 用量至 12 µl (20 µl 体系)。

[4] 建议总体积不小于 10 µl, 以免造成较大的加样误差。具体体积范围参考仪器说明。

注意: 本品预混了低浓度的 ROX Reference Dye, 适合需要低浓度 ROX 校准的仪器。不同类型仪器的 ROX 用量参照具体仪器说明, 下表仅供参考:

| Instruments   | Final Conc. of ROX |
|---|--------------------|
| ABI PRISM 7000/ PRISM 7700/ 7300/ 7900HT/ StepOne/ StepOnePlus/ GeneAmp 5700  | 500 nM, high ROX   |
| ABI 7500/ 7500 Fast/ ViiA 7/ QuantStudio 6/7/12K Flex; Agilent Stratagene Mx3000P/ Mx3005P/ Mx4000  | 50 nM, low ROX     |
| Bio-Rad CFX96/ CFX384/ iQ/ iQ5; MJ Research Opticon 2/ Chromo 4; Roche LightCycler 480/ 96; Corbett Rotor Gene G/ Q/ 3000/ 6000; Thermo PikoReal 96; Eppendorf MasterCycler ep realplex; Cepheid Smart Cycler | No ROX             |

#### 2. 设定反应程序进行 qPCR 反应

请根据实验需要参考以下示例进行程序设置:

两步法程序示例如下:

| Stage  |                                    | Temperature | Time   | Cycle |
|--|------------------------------------|-------------|--------|-------|
| Initial denaturation                             |                                    | 94°C        | 3 min  | 1     |
| Amplification                                    | Denaturation                       | 94°C        | 10 sec | 40    |
|  | Annealing&Extension <sup>[2]</sup> | 60°C        | 30 sec |       |
| Melting curve analysis (optional) <sup>[4]</sup> |                                    | 95°C        | 15 sec | 1     |
|  |                                    | 60°C        | 60 sec |       |
|  |                                    | 95°C        | 15 sec |       |

经典三步法扩增效率较高，程序示例如下：

| Stage  |                          | Temperature            | Time                  | Cycle |
|--|--------------------------|------------------------|-----------------------|-------|
| Initial denaturation                             |                          | 94°C                   | 3 min                 | 1     |
| Amplification                                    | Denaturation             | 94°C                   | 15 sec                | 40    |
|  | Annealing                | 55-65°C <sup>[1]</sup> | 15 sec                |       |
|  | Extension <sup>[2]</sup> | 72°C                   | 20 sec <sup>[3]</sup> |       |
| Melting curve analysis (optional) <sup>[4]</sup> |                          |                        |                       |       |

极速三步法可快速完成反应，程序示例如下：

| Stage  |                          | Temperature            | Time                    | Cycle |
|--|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------|
| Initial denaturation                             |                          | 94°C                   | 3 min                   | 1     |
| Amplification                                    | Denaturation             | 94°C                   | 5 sec                   | 40    |
|  | Annealing                | 55-65°C <sup>[1]</sup> | 5 sec                   |       |
|  | Extension <sup>[2]</sup> | 72°C                   | 5-10 sec <sup>[3]</sup> |       |
| Melting curve analysis (optional) <sup>[4]</sup> |                          |                        |                         |       |

[1] 最适退火温度需要摸索。退火温度一般设定为所用引物的  $T_m - 5^\circ\text{C}$ ，若低于  $55^\circ\text{C}$ ，则以  $T_m$  值为退火温度，一般不低于  $55^\circ\text{C}$ 。

[2] 在此步设置信号采集。

[3] 设置延伸时间时请考虑仪器类型，有些仪器需要设置 30 sec 以上。采用极速三步法时，150 bp 以内的扩增子可设置为 5 sec，150-300 bp 的扩增子可设置为 10 sec，300 bp 以上的扩增子可适当延长延长时间。

[4] 不同仪器熔解曲线采集程序不同，一般按仪器默认熔解曲线采集程序即可。

### 3. 分析结果

观察扩增曲线；调整基线，计算 Ct 值；观察熔解曲线检测特异性；进行相对或绝对定量。

#### 注意事项

- ① 使用前 Mix 需要完全解冻，充分混匀。尽量避免反复冻融。短期使用可避光保存于  $4^\circ\text{C}$ 。
- ② 本品灵敏度较高，在配制反应体系时注意避免气溶胶污染引起非特异性扩增。
- ③ 将  $(n+x)$  份反应液混匀后再分注到  $n$  个单管中，可降低加样误差。（ $n$  为重复次数， $x$  为损耗量，一般为  $n$  的  $1/10$ ）
- ④ 轻轻混匀反应液，避免产生气泡，气泡会干扰荧光检测。可瞬时离心去除气泡。
- ⑤ 引物的特异性、用量以及退火温度是影响实验结果的重要因素。务必设计特异性好的引物，随实验结果适当调整引物用量（ $0.05-0.9\ \mu\text{M}$ ）——特异性较差时减少引物用量，或以  $3^\circ\text{C}$  为增量提高退火温度，扩增效率较低时增加引物用量。
- ⑥ DNA 模板的量应小于 500 ng/反应，过高的模板量会引起非特异性扩增。应根据模板类型与基因表达量适当调整用量。
- ⑦ 熔解曲线的采集不是必须的，初次使用的引物建议进行熔解曲线采集。熔解曲线可以看出产物的特异性。产物特异性不好的原因有：引物特异性低；退火温度设置偏低；引物/模板浓度偏高；等。同时，建议通过琼脂糖凝胶电泳检测产物的特异性。

本品仅供科学研究使用。