

版本号: FP160112

# SuperReal PreMix Color (SYBR Green)

## SuperReal 彩色荧光定量预混试剂 (SYBR Green)

目录号: FP215

### 产品内容

产品组成	FP215-01 20 $\mu$ l $\times$ 125 rxn	FP215-02 20 $\mu$ l $\times$ 500 rxn	FP215-03 20 $\mu$ l $\times$ 5000 rxn
2 $\times$ SuperReal 彩色预混试剂 (含有SYBR Green I及蓝色指示剂)	1.25 ml	4 $\times$ 1.25 ml	10 $\times$ 4 $\times$ 1.25 ml
2 $\times$ SuperReal Color PreMix (with SYBR Green I & blue dye)			
50 $\times$ ROX 对照染料	250 $\mu$ l	1 ml	10 $\times$ 1 ml
50 $\times$ ROX Reference Dye			
40 $\times$ 样本稀释液(黄色)	1.25 ml	1.25 ml	10 $\times$ 1.25 ml
40 $\times$ Dilution Buffer (yellow)			
无RNA酶双蒸水	2 $\times$ 1 ml	5 $\times$ 1 ml	10 $\times$ 5 $\times$ 1 ml
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O			

### 储存条件

收到本产品后, 请立即置于-20 $^{\circ}$ C 避光保存。从-20 $^{\circ}$ C 取出使用时, 将冻存的2 $\times$  SuperReal Color PreMix和50 $\times$  ROX Reference Dye融解, 然后轻轻颠倒混匀, 待溶液完全均一后再行使用。如解冻后没有使用, 须彻底混匀后重新冷冻(在解冻过程中盐会出现分层现象, 未混匀进行冷冻, 盐晶体的析出将会对酶造成损害)。如需一段时间内经常取用, 可在2~8 $^{\circ}$ C 条件下储存3个月。避免反复多次冻融。

### 产品简介

本产品是采用SYBR Green I嵌合荧光法进行Real Time PCR的专用试剂。产品中预先混有Real Time PCR反应所需最适浓度的SYBR Green I, 是一种2 $\times$ 浓度的PreMix。产品额外添加了指示剂, 利于大量样品的加样, 减少误操作概率。

SuperReal Color PreMix采用了独特的双组分热启动DNA聚合酶(化学修饰的HotStar Taq DNA聚合酶和抗体修饰的Anti Taq DNA聚合酶), 配合精心优化buffer体系, 具有高扩增效率, 高扩增特异性和宽广的可信范围的特点。本升级版试剂在经过成分调整后, 扩增特异性上的优势更为突出。

---

## 试剂盒特点

1. SuperReal Color PreMix采用了独特的双组分热启动DNA聚合酶(化学修饰的HotStar Taq DNA聚合酶和抗体修饰的Anti Taq DNA聚合酶),从而构成酶活自动调节系统,配合精心优化buffer体系,具有高扩增效率,高扩增特异性和宽广的可信范围的特点。
2. 本产品Buffer体系平衡了K<sup>+</sup>和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>的比例,还特别添加了独创的H-Bond因子,能协同调整反应体系中的氢键作用力,使引物模板退火条件更加严谨,反应的专一性增强,重复性更好。
3. SuperReal Color PreMix中预混有SYBR Green I, PCR反应液配制时,只需加入模板、引物、无RNA酶超纯水便可进行Real Time PCR反应,操作简单方便。
4. 本产品附带ROX Reference Dye,用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差,方便客户针对不同型号荧光定量PCR仪时选择对应浓度使用。
5. 添加颜色指示剂,令加样更加简便,有效降低误操作概率。

## 试剂盒原理

本产品采用了独特的双组分热启动DNA聚合酶进行PCR扩增,通过检测反应进程中SYBR Green I的荧光强度,达到检测PCR产物扩增量的目的。

本产品中双热启动酶构成了独特的酶活自动调节系统。酶活自动调节系统是由化学修饰的HotStar Taq DNA聚合酶和抗体修饰的Anti Taq DNA聚合酶组成。其中HotStar Taq DNA聚合酶占绝大部分比例,其聚合酶活性的激活是严格依赖于95℃高温的一个缓释过程,而Anti Taq DNA聚合酶则在95℃高温下完全激活。经过95℃条件下孵育15 min激活大部分HotStarTaq DNA聚合酶,进入PCR循环后,每经过一轮95℃条件下变性,即可重新激活一部分HotStar Taq DNA聚合酶。HotStar Taq DNA聚合酶独特的酶活缓释机制使其可以与Anti Taq DNA聚合酶构成独特的酶活自动调节系统。PCR反应初期,完全激活的Anti Taq DNA聚合酶可以协同已经激活的HotStar Taq DNA聚合酶达到最佳酶活状态,而在整个PCR反应过程中,每一轮新释放的HotStar Taq DNA聚合酶活力刚好可以弥补因热变性所导致的部分酶活损失。因此,SuperReal Color PreMix在整个PCR反应过程始终保持最佳的DNA聚合酶活力,配合精心优化Buffer体系,从而可以获得高扩增效率,高扩增特异性和更加广泛性的模板适应性。

## 注意事项

1. PCR反应液中各颜色指示剂的终浓度应为1×,请根据模板的添加量计算Dilution Buffer的用量
  2. PCR反应的预变性条件必须设定为95℃ 15 min,用以充分激活热启动酶。
  3. 本产品中含有荧光染料SYBR Green I,保存本产品或配制PCR反应液时应避免强光照射。
  4. 如果试剂没有混匀,其反应性能会有所下降。使用时请上下颠倒轻轻混匀,请不要使用涡旋仪进行混匀,尽量避免出现泡沫,并经瞬时离心后使用。
  5. 引物终浓度为0.3 μM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。如果需要进一步优化,可以在0.2-0.5 μM范围内调整引物浓度。
  6. 20 μl反应体系中,基因组DNA或cDNA模板的使用量一般小于100 ng,逆转录产物作为模板时,使用量应不超过PCR体系终体积的20%。
-

## 操作方法

<1> 建立Real-Time PCR反应体系:

请注意将2×SuperReal Color PreMix和50×ROX Reference Dye避光保存。

1. 解冻2×SuperReal Color PreMix (如果保存在-20℃), 50×ROX Reference Dye, 模板, 引物、40×Dilution Buffer和RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀。
2. 建议置于冰上进行Real Time PCR反应液的配制。

**40×Dilution Buffer为黄色, 2×SuperReal Color PreMix为蓝色。如需稀释模板, 则最终反应体系应为绿色; 否则应为蓝色。如颜色不符, 请检查体系中是否正确加入相关组分。**

反应体系:

组成成分	50 μl 体系	25 μl 体系	20 μl 体系	终浓度
2×SuperReal Color PreMix	25 μl	12.5 μl	10 μl	1×
正向引物(10 μM)	1.5 μl	0.75 μl	0.6 μl	0.3 μM*
反向引物(10 μM)	1.5 μl	0.75 μl	0.6 μl	0.3 μM*
cDNA模板(含Dilution Buffer) <sup>▲</sup>	—	—	—	-ng-pg
50×ROX Reference Dye**	—	—	—	—
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	至50 μl	至25 μl	至20 μl	—

\*引物终浓度为0.3 μM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时, 可增加PCR反应体系中的引物浓度; 发生非特异扩增时, 可适当减少PCR反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的, 可以在0.2~0.5 μM范围内调整。

<sup>▲</sup>如需稀释模板, 应先将cDNA模板与40×Dilution Buffer按一定比例混合成稀释模板。稀释比例如下:

20 μl反应体系中cDNA用量与40×Dilution Buffer含量对应表:

20 μl PCR体系中稀释模板的添加量	1 μl	2 μl	2.5 μl	3 μl	4 μl	5 μl	6 μl
稀释模板中Dilution Buffer的浓度	20×	10×	8×	6.7×	5×	4×	3.3×
100 μl稀释模板中所需40×Dilution Buffer的量	50 μl	25 μl	20 μl	16.7 μl	12.5 μl	10 μl	8.4 μl
100 μl稀释模板中所需cDNA的量	50 μl	75 μl	80 μl	83.3 μl	87.5 μl	90 μl	91.6 μl

50  $\mu$ l 反应体系中cDNA用量与40 $\times$  Dilution Buffer含量对应表:

50 $\mu$ l PCR体系中稀释模板添加量	2 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	3 $\mu$ l	4 $\mu$ l	5 $\mu$ l	6 $\mu$ l	8 $\mu$ l
稀释模板中所需 Dilution Buffer的浓度	25 $\times$	20 $\times$	16.7 $\times$	12.5 $\times$	10 $\times$	8.3 $\times$	6.25 $\times$
100 $\mu$ l 稀释模板中所需 40 $\times$ Dilution Buffer的量	62.5 $\mu$ l	50 $\mu$ l	41.7 $\mu$ l	31.3 $\mu$ l	25 $\mu$ l	20.8 $\mu$ l	15.6 $\mu$ l
100 $\mu$ l 稀释模板中所需 cDNA的量	37.5 $\mu$ l	50 $\mu$ l	58.3 $\mu$ l	68.7 $\mu$ l	75 $\mu$ l	79.2 $\mu$ l	84.4 $\mu$ l

\*\* 几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表:

仪器	终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/StepOne等	5 $\times$ (例如: 5 $\mu$ l ROX/50 $\mu$ l体系)
ABI 7500、7500 Fast; Stratagene Mx3000P、Mx3005P和Mx4000等	1 $\times$ (例如: 1 $\mu$ l ROX/50 $\mu$ l体系)
Roche仪器, Bio-Rad仪器, Eppendorf仪器等	无需添加

## <2>进行Real time PCR反应

建议采用两步法PCR反应程序进行反应。当出现模板浓度过低引起非特异扩增, 引物 T<sub>m</sub>值较低导致的扩增效率低下或扩增曲线重现性不佳等现象时, 建议尝试进行三步法PCR 扩增反应。

两步法反应程序:

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1 $\times$	95 $^{\circ}$ C	15 min	预变性	否
PCR反应	40 $\times$	95 $^{\circ}$ C	10 sec	变性	否
		60-66 $^{\circ}$ C <sup>▲1</sup>	20-32 sec*	退火/延伸	是
熔解曲线分析(Melting/Dissociation Curve Stage)					

三步法反应程序:

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1 $\times$	95 $^{\circ}$ C	15 min	预变性	否
PCR反应	40 $\times$	95 $^{\circ}$ C	10 sec	变性	否
		50-60 $^{\circ}$ C <sup>▲2</sup>	20 sec	退火	否
		72 $^{\circ}$ C	20-32 sec*	延伸	是
熔解曲线分析(Melting/Dissociation Curve Stage)					

▲<sup>1</sup> 请先使用60°C 32 sec (20 sec, 30 sec, 31sec.)进行扩增。如果需要进一步优化，可以尝试在60-66°C 范围内进行。

▲<sup>2</sup> 通常引物退火温度比引物的解链温度(Tm)低5°C，如果引物碱基数较少，可以适当提高退火温度，这样可以使PCR的特异性增加；如果碱基数较多，那么可以适当减低退火温度。

\*使用不同型号仪器进行时间设定时，请按照仪器使用说明书要求进行实验操作，几种常见仪器的时间设定见下表：

使用时Roche LightCycler/ LightCycler 480请设定在20 sec。
使用ABI 7500 Fast/7900HT/7900HT Fast/ViiA 7/StepOne/StepOnePlus时请设定在30 sec。
使用ABI 7000和7300时请设定在31 sec。
使用ABI 7500时请设定在32 sec。

3. 盖上反应管，轻柔混匀。可短暂离心，确保所有组分均在管底。

4. 将反应体系置于荧光定量PCR仪中，开始反应。

以使用ABI 7500 Real Time PCR扩增仪为例，进行扩增效率优化时，可以按照下表中所示优化方案1或优化方案2的反应条件进行反应：

基本反应程序			优化方案1 (增加两步法延伸时间进行优化)	优化方案2 (使用三步法进行PCR反应)	
循环	温度	时间	时间	温度	时间
1×	95°C	15 min	15 min	95°C	15 min
40×	95°C	10 sec	10 sec	95°C	10 sec
	60°C	32 sec	32-60 sec	55°C	30 sec
	NA			72°C	32 sec

以使用ABI 7500 Real Time PCR扩增仪为例，进行特异性优化的参考方案：

基本反应程序			特异性优化方案 (提高两步法退火温度)	
循环	温度	时间	温度	时间
1×	95°C	15 min	95°C	15 min
40×	95°C	10 sec	95°C	10 sec
	60°C	32 sec	60-64°C	32 sec

## 进行RT-qPCR反应时的操作建议

进行RT-PCR反应时，有两种cDNA第一链合成试剂盒可以选择，分别是FastQuant cDNA第一链合成试剂盒(KR106)和TIANScript II cDNA第一链合成试剂盒(KR107)。其中FastQuant cDNA第一链合成试剂盒是专为两步法RT-PCR第一步实验配制的，具有高灵敏度的RT-PCR反应系统，可以从极低量的总RNA或poly (A)<sup>+</sup> RNA合成第一链cDNA。该试剂盒中使用的逆转录酶Quant Reverse Transcriptase与通常使用的Moloney鼠白血病毒来源的M-MLV和鸟成髓细胞病毒来源的AMV不同，是一种使用大肠杆菌工程菌进行重组表达的全新高效逆转录酶。该酶能够高效转录多种RNA模板，最大限度将RNA转录成cDNA第一链。

以FastQuant RT Kit (with gDNase) (KR106) 为例，下列操作步骤适用于模板量为50 ng-2 μg的总RNA。

1. 将模板RNA在冰上解冻；5×gDNA Buffer、FQ-RT Primer Mix、10×Fast RT Buffer、RNase-Free ddH<sub>2</sub>O在室温(15-25℃)解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

以下操作步骤请在冰上进行。为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先配制成Mix，然后再分装到每个反应管中。

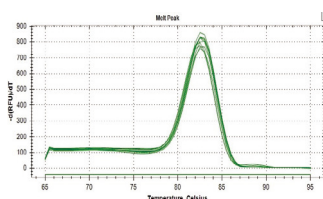
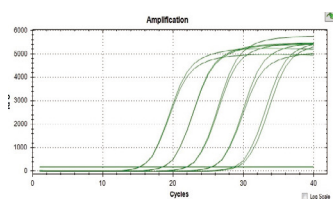
2. 按照表1的基因组DNA的去除体系配制混合液，彻底混匀。简短离心，并置于42℃，孵育3 min。然后置于冰上放置。
3. 按照表2的反转录反应体系配制混合液。
4. 将反转录反应中的Mix加到gDNA去除步骤的反应液中，充分混匀。
5. 42℃，孵育15 min；95℃，孵育3 min。
6. 进行PCR反应

表1 gDNA去除反应体系

组成成分	使用量
5×gDNA Buffer	2 μl
Total RNA	-
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	补足到10 μl

表2 反转录反应体系

试剂	使用量
10×Fast RT Buffer	2 μl
RT Enzyme Mix	1 μl
FQ-RT Primer Mix	2 μl
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	补足到10 μl



本实验是应用两步法定量RT-PCR对人Jurkat cell的Hsc mRNA进行定量检测。荧光定量PCR是使用SuperReal Color PreMix (FP215)。cDNA合成是使用FastQuant RT Kit (KR106)进行。cDNA用量相当于100ng-10pg总RNA。扩增曲线(左图)和熔解曲线(右图)显示扩增效率和特异性良好。

## 引物设计说明

进行Real Time PCR反应时，PCR引物的设计非常重要。设计PCR扩增效率高，反应特异性强的引物可以参考以下要求。

◆设计引物要求如下：

引物长度	18-30个碱基
GC含量	40-60%
Tm值	引物软件都可以给出Tm，与引物长度，碱基组成，引物使用缓冲的离子强度也有关。 上下游引物的Tm值要尽量接近。 简单的Tm计算公式为： $Tm = 4^{\circ}C(G + C) + 2^{\circ}C(A + T)$ 。 一般采用较引物Tm值低5 $^{\circ}C$ 作为PCR退火温度。 提高退火温度可以增加PCR反应的特异性。
引物及PCR扩增产物序列	PCR扩增产物长度最好在80-200 bp之间。 尽量避开在模板的二级结构区域设计引物。 避免上下游引物3'端之间形成2个或以上的互补碱基以减少引物二聚体的形成。 引物3'端碱基不能有多于3个连续的G或C。 引物自身不应存在互补序列，否则引物自身会折叠成发夹状结构。 避免引物3'末端碱基为T。 引物序列中A、T、G、C要尽量均匀分布。

## 常见问题

### 1. 无扩增信号或扩增曲线起峰晚或仅有引物二聚体

原因	解决办法
DNA模板中存在抑制剂	重新纯化模板或降低模板使用量
Mg <sup>2+</sup> 浓度不合适	使用2× SuperReal Color PreMix时，PCR反应体系中Mg <sup>2+</sup> 的终浓度为2 mM。对有些扩增体系，可以将Mg <sup>2+</sup> 终浓度提高到5 mM。进行Mg <sup>2+</sup> 终浓度优化时，建议每次增加0.5 mM Mg <sup>2+</sup> 浓度进行实验。
加样错误或试剂问题	检查试剂浓度和保存条件，包括所使用的引物和模板。重复进行实验。
热启动酶未能激活	使用试剂时，请确保预变性条件为95 $^{\circ}C$ 15 min，用以有效激活热启动DNA聚合酶。
PCR条件、引物序列或浓度不当	请确认引物未发生降解，引物浓度及PCR条件，扩增不好时，通常先尝试降低退火温度，延长退火时间和提高引物浓度，有时也可以提高退火温度，增加延伸时间，降低升温速度。对于GC含量高的模板，可以适当延长变性时间。如果还是扩增不好，请重新设计引物。
起始模板问题	检查起始模板的浓度，保存条件和质量。重新对模板进行线性梯度稀释，并用新稀释模板进行实验。增加起始模板使用量。

## 2. NTC出现较高的荧光值

原因	解决办法
试剂污染	建议使用新试剂进行实验。
PCR反应液配制时发生污染	采取必要的防污染策略(如使用带滤芯的枪头)。
引物出现降解	可以使用变性聚丙烯酰胺胶检测引物降解情况。

## 3. 出现引物二聚体和(或)非特异扩增

原因	解决办法
Mg <sup>2+</sup> 浓度不合适	使用2× SuperReal Color PreMix的反应体系含有Mg <sup>2+</sup> 的终浓度为2 mM。对有些扩增体系，可以将Mg <sup>2+</sup> 终浓度增加到5 mM。建议每次增加0.5 mM Mg <sup>2+</sup> 浓度进行优化。
PCR退火温度太低	建议每次增加2°C进行退火温度优化。
引物设计不合适	考虑重新设计引物序列。
PCR产物太长	荧光定量PCR产物长度最好在100-150 bp之间，而且不应该超过500 bp。
引物出现降解	可以使用变性聚丙烯酰胺胶检测引物降解情况。
计量误差	反应体积太小会导致检测精度下降。请根据定量PCR仪推荐的反应体积重新实验。

## 4. 定量值重现性差

原因	解决办法
仪器方面的故障	因为仪器的不适用，在温度管理或检测时产生重现性差。请根据相应仪器的说明书进行点检。
样品纯度不好	不纯的样品会导致实验的重现性差。
稀释的模板放置太久	通过梯度稀释的模板最好现配现用。
引物质量下降	尽量避免新合成引物批次间的差异，可以使用原来质量好的引物做为对照。
PCR 反应条件、引物浓度、序列等不恰当	扩增效率差的PCR 容易产生重现性差。通过变更引物的浓度或PCR 反应条件来进行调整。扩增不好时，一般可降低退火温度或提高引物浓度，也可以延长延伸时间。如模板的GC含量较高，可延长变性时间。仍得不到改善时，建议重新设计引物。
计量误差	反应体积太小会导致检测精度下降。请根据定量PCR仪推荐的反应体积重新实验。