

版本号: FP151203

# SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)

## SuperReal 荧光定量预混试剂 增强版 (SYBR Green)

目录号: FP205

### 产品内容

产品组成	FP205-01 20 $\mu$ l $\times$ 125 rxn	FP205-02 20 $\mu$ l $\times$ 500 rxn	FP205-03 20 $\mu$ l $\times$ 5000 rxn
2 $\times$ SuperReal PreMix Plus (with SYBR Green I)	1.25 ml	4 $\times$ 1.25 ml	10 $\times$ 4 $\times$ 1.25 ml
50 $\times$ ROX Reference Dye	250 $\mu$ l	1 ml	10 $\times$ 1 ml
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	2 $\times$ 1 ml	5 $\times$ 1 ml	10 $\times$ 5 $\times$ 1 ml

### 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 PreMix Plus 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 $\sim$ 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, 反应液配制十分简单方便。

SuperReal PreMix Plus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 PreMix Plus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 PreMix Plus中预混有SYBR Green I, PCR反应液配制时,只需加入模板、引物、灭菌蒸馏水便可进行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。

## 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 PreMix Plus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反应的预变性条件必须设定为95℃ 15 min,用以充分激活热启动酶。
2. 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。
3. 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,请不要使用振荡器进行混匀,尽量避免出现泡沫,并经瞬时离心后使用。
4. 引物纯度对反应特异性影响很大,建议使用PAGE级别以上纯化的引物。
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 PreMix Plus和50 × ROX Reference Dye避光保存。

1. 溶解2 × SuperReal PreMix Plus(如果保存在-20℃), 50 × ROX Reference Dye, 模板, 引物和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。

### 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 PreMix Plus	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	—	—	—	-ng-pg
50 × ROX Reference Dye <sup>△</sup>	—	—	—	—
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>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 × (例如: 5 μl ROX/50 μl体系)
ABI 7500、7500 Fast; Stratagene Mx3000P、Mx3005P和Mx4000等	1 × (例如: 1 μl ROX/50 μl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 ×	95°C	15 min	预变性	否
PCR反应	40 ×	95°C	10 sec	变性	否
		60-66°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 ×	95°C	15 min	预变性	否
PCR反应	40 ×	95°C	10 sec	变性	否
		50-60°C <sup>△2</sup>	20 sec	退火	否
		72°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(T<sub>m</sub>)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, 可以按照下表中所显示优化方案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 (提高两步法退火温度)			特异性优化方案	
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

<3> Real Time PCR反应举例：

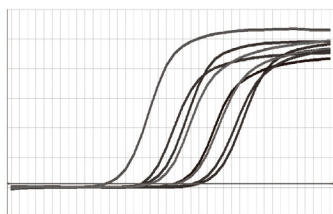


图1 扩增曲线

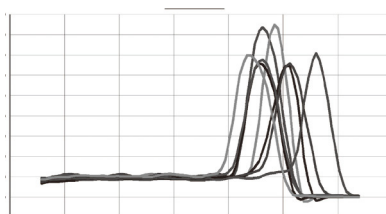


图2 熔解曲线

图1. 以单链cDNA为模板，用SuperReal PreMix Plus(FP205)进行8对不同检测体系的qPCR实验，之后进行熔解曲线分析。结果显示，熔解曲线均为单一峰，未发现非特异性扩增和引物二聚体产生(图2)。cDNA的合成使用FastQuant cDNA第一链合成试剂盒(KR106)。

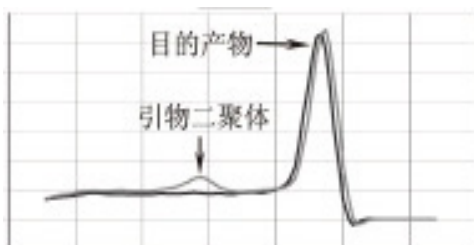


图3 熔解曲线分析

图3. 同一反应体系，使用SuperReal PreMix Plus(FP205)的熔解曲线仅有单一峰，为特异性扩增产物，其 $T_m$ 值为83°C；使用国外A公司试剂除了特异性扩增产物外，还出现了引物二聚体。引物二聚体的 $T_m$ 值一般在75°C左右。

## 进行RT-qPCR反应时的操作建议

进行RT-qPCR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-qPCR第一步实验配制的，具有高灵敏度的RT-qPCR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 cDNA第一链合成试剂盒(KR106)为例，下列操作步骤适用于模板量为50 ng-2 μg的总RNA。

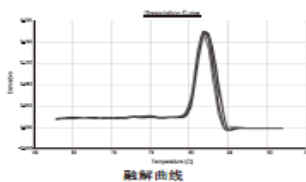
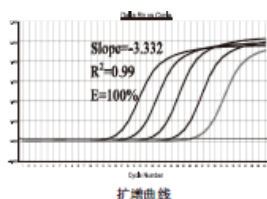
1. 将模板RNA在冰上解冻；5×gDNA Buffer、FQ-RT Primer Mix、10×Fast RT Buffer、RNase-Free ddH<sub>2</sub>O在室温(15-25℃)解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。  
以下操作步骤请在冰上进行。为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先配制成Mix，然后再分装到每个反应管中。
2. 按照表1的gDNA的去除体系配制混合液，彻底混匀。简短离心，并置于42℃，孵育3 min。然后置于冰上放置。
3. 按照表2的反转录反应体系配制混合液。
4. 将反转录反应中的Mix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之后放于冰上，得到的cDNA可用于后续实验，或低温保存。
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GAPDH mRNA进行定量检测。荧光定量PCR是使用SuperReal PreMix Plus(FP205)。cDNA合成是使用FastQuant cDNA第一链合成试剂盒进行(KR106)，cDNA用量相当于10 pg-100 ng总RNA。

## 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 PreMix Plus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 PreMix Plus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。