

ChamQ™ SYBR® Color qPCR Master Mix (High ROX Premixed)

Q441-01/02/03

Version 8.1



Vazyme Intotech Co., Ltd.

产品简介

本产品是使用SYBR® Green I 嵌合荧光法进行qPCR反应的专用预混液。核心组分Champegne™ Taq DNA Polymerase为一种新型的抗体法热启动DNA聚合酶，具有特异性强、检测灵敏度高等诸多优点，配以针对qPCR优化的最适Buffer以及专利特异性促进因子Exactor™，非常适合于进行高特异性、高灵敏度的qPCR反应。此外，本品可利用不同染料混合后产生的变色效应追踪移液过程，从而显著减少移液错误。预混液中含有qPCR反应最适浓度SYBR® Green I，是一种2 × 预混合试剂，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因定量准确、重复性好、可信度高。

产品组成

| 组分 | Q441-01 (125 nm / 20 µl reaction) | Q441-02 (500 nm / 20 µl reaction) | Q441-03 (2,500 nm / 20 µl reaction) |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| 2 × ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (High ROX Premixed) ^a | 1.25 ml | 1.25 ml × 4 | Q441-02 × 6 |
| 10 × Dilution Buffer ^b | 1.25 ml | 1.25 ml | |

a. 包含dNTP, Mg²⁺, Champagne Taq DNA Polymerase, SYBR Green I, 蓝色显色染料, ROX Reference Dye 1 等。

b. 10 × 黄色浓缩模板稀释液。

通用机型

本产品中预混了用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差的ROX Reference Dye 1 (高浓度)，适用于以下荧光定量PCR仪：

Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOnePlus™。
以及其他需要添加高浓度ROX Reference Dye的荧光定量PCR仪。

储存条件

2 × ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (High ROX Premixed)：长期储存应置于-20℃避光；如短期内反复使用，解冻后可于4℃避光条件下稳定存放6个月；10 × Dilution Buffer：于-20℃保存。

注意：Master Mix解冻后可能出现些许白色沉淀，置于室温放置片刻并上下颠倒沉淀即会溶解。请确认沉淀完全溶解，并充分混匀后使用。

注意事项

使用本试剂盒可实现移液过程追踪：2 × ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (High ROX Premixed) 中包含蓝色染料，而10 × Dilution Buffer中包含黄色染料。当ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix(蓝色)中加入了用Dilution Buffer稀释的扩增模板(黄色)后会产生蓝色→绿色的变色效应，从而可以根据液体颜色准确判断是否已加入模板。以下为使用本品时的注意事项，使用前请务必仔细阅读：

1) 10 × Dilution Buffer为专用浓缩模板稀释液。使用过程中，如需要进行移液追踪，则根据下表选择合适的方式提前添加Dilution Buffer至模板中，然后进行qPCR检测；如不需要进行移液追踪，则不使用Dilution Buffer即可。

| 模板状态 | 实例 | 10 × Dilution Buffer使用方式 | 模板中Dilution Buffer浓度 |
|-------|-------------------|---|----------------------|
| 冻块/粉末 | 未溶解DNA沉淀冻块 | 使用ddH ₂ O将10 × Dilution Buffer稀释至1 ×。符合运体积的1 × Dilution Buffer用作溶解液溶解冻块/粉末 | 1 × |
| 溶液 | cDNA溶液，已溶解的质粒、基因组 | 如有必要，先使用ddH ₂ O将模板稀释至目标浓度，然后在每9 µl模板中加入1 µl 10 × Dilution Buffer | 1 × |

注：实际使用过程中也可使用其他添加方法，总的使用原则为最终模板中Dilution Buffer浓度为1 ×。

2) 如使用Dilution Buffer进行移液追踪(qPCR模板中已包含1 × Dilution Buffer)，模板使用体积请勿超出2 - 6 µl/20 µl reaction范围。如果模板使用量低于2 µl/20 µl reaction，会造成显色偏淡，影响追踪效果；如果模板使用量高于5 µl/20 µl reaction，Dilution Buffer中的有效成分又可能会干扰qPCR反应。

3) 经过反复测试，按照推荐方法使用Dilution Buffer进行移液追踪在绝大多数情况下对qPCR反应无影响。但如果使用方式不当，有可能对qPCR结果产生一定的影响。因此，当反应性能不佳时，可尝试不使用Dilution Buffer，以排除其影响反应性能的可能。

4) 本品附赠一块白色加样底板，当使用透明管/板进行混样时，将底板置于透明管/板下方可显著提高颜色对比度，使移液追踪更轻松。

质量控制

纯度检测：所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶、核酸残留。

功能检测：以100 ng HeLa 总RNA 逆转录产物的稀释梯度为模板扩增B2M基因。扩增效率位于0.95-1.05之间，10⁶稀释梯度Ct 值 < 35。

应用实例 (以ABI StepOnePlus™为测试机型)

1. 在qPCR管中配制如下混合液

| | |
|--|------------|
| 2 × ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (High ROX Premixed) | 10.0 μl |
| Primer1 (10 μM) | 0.4 μl |
| Primer2 (10 μM) | 0.4 μl |
| Templates DNA/cDNA | x μl |
| ddH ₂ O | To 20.0 μl |

注: 反应体系中各成分含量可根据以下原理自行调整:

- a. 一般来说反应体系中引物浓度为 0.2 μM 即可得到较好的扩增效果, 当反应性能比较差时, 可以在此浓度 0.1-1.0 μM 范围内调整引物浓度。
- b. qPCR 灵敏度很高, 建立反应体系时加入模板量的准确程度对测定结果会有很大的影响, 推荐将模板稀释后 (如每瓶重 2-6 μg 样本) 加入反应体系中, 这样可以有效提高实验的重复性。

特别提醒 1: 当模板中已经包含 1 × Dilution Buffer 时, 根据加入体积切勿超过 2-5 μl/20 μl reaction 范围, 推荐范围内模板使用体积越大, 颜色变化越明显。

特别提醒 2: 当模板类型为未经稀释 cDNA 原液时, 不论其是否包含 1 × Dilution Buffer, 使用体积均不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10, 即 2 μl/20 μl reaction。

c. 扩增产物长度越短扩增效率越高, 推荐扩增产物长度为 60 bp-150 bp。

2. 按下列条件进行qPCR反应

| | | | | |
|---------|--------------------|----------|-------------------------|----------------------------|
| Stage 1 | 预变性 ¹⁾ | Reps: 1 | 95 °C | 30 sec |
| Stage 2 | 循环反应 ²⁾ | Reps: 40 | 95 °C 60 °C | 10 sec 30 sec |
| Stage 3 | 融解曲线 ³⁾ | Reps: 1 | 95 °C 60 °C 95 °C | 15 sec 60 sec 15 sec |

¹⁾ 预变性条件适合绝大多数扩增反应, 如模板结构复杂, 可将预变性时间延长至 3 min 以提高预变性效果。

²⁾ 对于 300 bp 以内的扩增子而言, 延伸时间设置为 30 sec 即可; 超过 300 bp 的扩增子, 推荐延长延伸时间至 60 sec。

³⁾ 仪器类型不同, 融解曲线采集程序不尽相同, 使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

反应体系优化方案

优秀的反应体系应具备一些特征, 按照重要程度从高到低排列依次为: 融解曲线单峰(扩增特异性)、扩增效率 α 值接近100%(扩增效率)、Ct值小(扩增效率), 如使用默认反应条件反应性能不佳时, 可根据下述方案进行反应条件优化, 选择最适宜实验条件时需综合考虑扩增特异性和扩增效率两方面指标。

1) 引物浓度与反应性能之间的关系: 当引物浓度在 0.1 μM - 1.0 μM 范围之间变化时, 引物浓度越高, 扩增特异性越强, 但扩增效率越高。

2) 扩增程序与反应性能之间的关系:

需提高扩增特异性, 可使用两步法扩增程序或提高退火温度



需提高扩增效率, 可延长两步法程序延伸时间或使用三步法程序:



3) 预变性时间: 默认预变性条件 95°C/30 sec 能使绝大多数模板充分变性; 如怀疑模板复杂程度高变性不充分, 可将预变性时间延长至 3 min 以提高预变性效果。

常见问题与解决方案

1) 扩增曲线形状异常

- a) 扩增曲线不光滑: 信号太弱, 经系统校正后产生, 提高模板浓度重复试验; ROX 类型使用错误, 确认所用 ROX 与机型是否匹配。
- b) 扩增曲线渐弱或下滑: 模板浓度太高, 基线的终点值大于 Ct 值, 减小基线终点 (Ct 值 - 4), 重新分析数据。
- c) 个别扩增曲线突然中断: 反应管内固有气泡, 处理样本时要注意离心, 进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

2) 反应结束无扩增曲线出现

- a) 确认程序中是否设置了信号采集步骤: 两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段; 三步法扩增程序应当将信号采集设置在 72°C 延伸阶段。
- b) 确认引物是否降解: 长时间未用的引物应先通过 PAGE 电泳检测完整性, 以排除其降解的可能性。
- c) 模板浓度太低: 减少稀释度重复试验, 一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- d) 模板降解: 重新制备模板, 重复试验。

3) Ct 值出现太晚

- a) 扩增效率太低: 优化反应条件, 尝试三步法扩增程序, 或者重新设计引物。
- b) 模板浓度太低或降解: 减少稀释度重复试验, 一般未知浓度的样品先从最高浓度做起; 重新制备模板, 重复试验。
- c) PCR 产物太长: 推荐 PCR 产物长度为 60 bp-150 bp。
- d) 体系中存在 PCR 抑制剂: 一般为模板带入, 加大模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验。
- e) 当模板中包含 Dilution Buffer 时, 检查确认其浓度和模板使用体积是否正确; 尝试不使用 Dilution Buffer 重复试验。

4) 阴性对照也出现明显扩增

- a) 反应体系污染: 更换试剂瓶、水、引物重复试验, 反应体系在超净工作台内配制, 减少气溶胶污染。
- b) 引物二聚体的出现: 一般在 35 循环以后阴性对照出现扩增属正常情况, 可配合融解曲线进行分析。

5) 绝对定量时标准曲线线性关系不佳

- a) 加样误差: 提高模板稀释倍数, 提高加样体积。
- b) 标准品降解: 重新制备标准品, 重复试验。
- c) 模板浓度太高: 提高模板稀释倍数。

6) 融解曲线出现多峰

- a) 引物设计不优化: 根据设计原则设计新的引物。
- b) 引物浓度太高: 适当降低引物浓度。
- c) cDNA 模板带有基因组污染: 重新制备 cDNA 模板。

7) 实验重复性差

- a) 加样体系不准: 使用性能较好的移液枪, 扩大反应体积, 将模板做高倍稀释, 以大体积加入反应体系中。
- b) 定量 PCR 仪不同位置温度控制不一致: 定期校准仪器。
- c) 模板浓度太低: 模板浓度越低, 重复性越差, 减少模板稀释度或提高加样体积。