

## Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (High Rox Plus)

### 产品简介

Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix(High Rox Plus)是 2×实时定量 PCR 扩增的预混合溶液。Mix 中含有热启动 Hieff® DNA Polymerase、SYBR Green I、dNTPs、Mg<sup>2+</sup>及 HighRox。使用时，仅需在扩增体系中加入模板和引物即可进行实时荧光定量 PCR，大大简化操作过程，降低污染几率。

本品采用的 DNA 聚合酶配体可以随温度变化实时调节 DNA 聚合酶活性。配方添加了有效抑制非特异性 PCR 扩增的因子和提升 PCR 反应扩增效率的因子，使定量 PCR 可以在宽广的定量区域内获得良好的线性关系。

### 产品信息

货号	11203ES03 / 11203ES08 / 11203ES50 / 11203ES60
规格	1 mL / 5×1 mL / 50×1 mL / 100×1 mL

### 储存条件

-25~-15°C保存，有效期 18 个月。本品避免反复冻融。产品中含有荧光染料 SYBR Green I，保存或配制反应体系时需避免强光照射。

### 使用说明

#### 1. 推荐反应体系(推荐冰上配制)\*\*\*\*\*

组分	体积 (μL) ****	体积 (μL)	终浓度
Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (High Rox Plus)*	25	10	1×
Forward Primer (10 μM)**	1	0.4	0.2 μM
Reverse Primer (10 μM)**	1	0.4	0.2 μM
模板 DNA***	X	X	-
无菌超纯水	to 50	to 20	-

\* 使用前务必充分混匀，避免剧烈震荡产生过多气泡。

\*\* 通常引物终浓度为 0.2 μM，也可根据情况在 0.1-1.0 μM 之间进行调整。

\*\*\* 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。cDNA 原液建议 5-10 倍稀释，最佳模板加入量以扩增得到的 CT 值在 20-30 个循环为好。

\*\*\*\* 推荐使用 20 μL 或 50 μL，以保证目的基因扩增的有效性和重复性。

\*\*\*\*\* 请于超净工作台内配制，并使用无核酸酶残留的枪头、反应管；推荐使用带滤芯的枪头。避免交叉污染和气溶胶污染。

#### 2. 反应程序

##### 1) 两步法扩增程序\*

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性**	95°C	5 min	1
扩增反应	95°C	10 sec	40
	60°C***	30 sec****	
熔解曲线	仪器默认设置		1

## 2) 三步法扩增程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性**	95°C	5 min	1
扩增反应	95°C	10 sec	40
	55-60°C***	20 sec	
	72°C	20 sec****	
熔解曲线	仪器默认设置		1

\* 高特异性可选择两步法，高效率扩增可选择三步法。

\*\* 预变性时间可根据不同模板和引物的具体情况可适当缩短至 2 min。

\*\*\* 退火温度和时间请根据引物和目的基因的长度进行调整。

\*\*\*\* 荧光信号采集请按照仪器使用说明书要求进行实验程序设置，几种常见仪器的时间设定如下：

30sec 以上：Applied Biosystems: StepOne, StepOne Plus, 7500 Fast; Roche Applied Science: LightCycler 480; Bio-Rad: CFX96

31sec 以上：Applied Biosystems: 7300

34sec 以上：Applied Biosystems: 7500

## 3. 适用机型

Applied Biosystems: 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT FAST, StepOne, StepOne Plus.

## 4. 结果分析

定量实验至少需要三个生物学重复。反应结束后需要确认扩增曲线及熔解曲线。

1) 扩增曲线：标准扩增曲线为 S 型。

Ct 值落在 20-30 之间时，定量分析最准确；

Ct 值小于 10，需要将稀释模板后，重新进行实验；

Ct 值介于 30-35 之间时，需要提高模板浓度，或者增大反应体系的体积，以提高扩增效率，保证结果分析的准确性；

Ct 值大于 35 时，检测结果无法定量分析基因的表达量，但可用于定性分析。

2) 熔解曲线：

熔解曲线单峰，表明反应特异性好可以进行定量结果分析；若熔解曲线出现双峰或者多峰，则不能进行定量分析。

熔解曲线出现双峰，需要通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳判断非目标峰是引物二聚体还是非特异性扩增。

如果是引物二聚体，建议降低引物浓度，或者重新设计扩增效率高的引物。

如果是非特异性扩增，请提高退火温度，或者重新设计更高特异性的引物。

## 5. 引物设计指南

1) 推荐引物长度 25 bp 左右。扩增产物长度 150 bp 为佳，可以在 100 bp-300 bp 内选择。

- 2) 正向引物和反向引物的 Tm 值相差不宜超过 2°C。引物 Tm 值 60°C-65°C 为佳。
- 3) 引物碱基分布要均匀，避免出现连续的 4 个相同碱基，GC 含量控制在 50% 左右。3' 端最后一个碱基最好为 G 或 C。
- 4) 引物内部或者正反两条引物间最好避免出现有 3 个碱基以上的互补序列。
- 5) 引物特异性需要用 NCBI BLAST 程序进行核对。避免引物 3' 端有 2 个碱基以上的非特异性互补。
- 6) 设计完成的引物需要进行扩增效率的检测，只有具备相同扩增效率的引物才可用于定量比较分析。

## 注意事项

1. 本产品仅作科研用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
3. 解冻后 Master Mix 可能出现絮状物质，4°C 放置并上下颠倒混匀至溶液澄清，不影响试剂性能。
4. 推荐使用本公司 cDNA 合成试剂盒（货号：11141ES），以有效去除 RNA 样品中残留的基因组。