

版本号: FP130820

FastFire qPCR PreMix (SYBR Green)

FastFire快速荧光定量PCR预混试剂

(SYBR Green)

目录号: FP207

产品内容

产品组成	FP207-01 20 μ l \times 125 rxn	FP207-02 20 μ l \times 500 rxn	FP207-03 20 μ l \times 5000 rxn
2 \times FastFire qPCR PreMix (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 μ l	1 ml	10 \times 1 ml
RNase-Free ddH ₂ 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FastFire qPCR PreMix和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, 可对目标DNA进行快速、特异性的定量检测。优化的预混液可缩短Real-Time PCR的反应时间, 适用于标准或快速PCR仪。

FastFire qPCR PreMix采用了抗体修饰的Anti Taq DNA聚合酶, 配合独特的快速PCR Buffer体系可确保在所有的Real-Time PCR仪上进行灵敏的qPCR反应, 具有反应快速、PCR反应时间缩短60%, 同时具有高扩增效率, 高扩增特异性和宽广的可信范围的特点, 使你在不影响PCR效果的前提下更快获得结果, 节约科研时间和能源。

试剂盒特点

1. FastFire qPCR PreMix采用了抗体修饰的Anti Taq DNA聚合酶，配合特制的快速PCR Buffer体系，可大大缩短变性、退火与延伸时间，可节省多达60%的反应时间，快速获得实验结果。
2. 本产品特制的快速PCR Buffer 体系含有独特的PCR稳定因子，在不损失PCR灵敏度和特异性的基础上进行快速反应，保证了FastFire qPCR PreMix高扩增效率，高扩增特异性和宽广的可信范围的特点。。
3. FastFire qPCR PreMix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快速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

本产品采用了特异的抗体修饰热启动DNA聚合酶进行快速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，适用于标准和快速PCR仪。

1. 本产品中特异的抗体修饰热启动DNA聚合酶，95℃条件下孵育1 min即可激活全部酶活，在缩短变性时间的同时避免了非特异性产物的扩增。
2. 本产品的快速 PCR Buffer体系添加了独特的PCR稳定因子，配合精心优化的快速PCR Buffer体系，可大大缩短变性、退火和延伸时间，使PCR总运行时间缩短60%，更快获得实验结果，而不影响PCR反应效果。
3. 本产品针对cDNA模板和gDNA模板结构组成的差异，对PCR的反应步骤进行了特别的优化，使较难扩增的gDNA模板也能获得良好的PCR结果。

注意事项

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. 20 μl 反应体系中，cDNA模板的使用量一般小于100 ng，基因组DNA模板量一般小于50 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FastFire qPCR PreMix和ROX Reference Dye避光保存。

1. 融解FastFire qPCR PreMix (如果保存在-20°C), ROX Reference Dye, 模板, 引物
和RNase-Free ddH₂O, 并将所有试剂在室温下溶解并彻底混匀。

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× FastFire qPCR PreMix	25 µl	12.5 µl	10 µl	1×
正向引物 (10 µM)	1.5 µl	0.75 µl	0.6 µl	300 nM*
反向引物 (10 µM)	1.5 µl	0.75 µl	0.6 µl	300 nM*
cDNA模板	—	—	—	-ng-pg
50× ROX Reference Dye△	—	—	—	—
RNase-Free ddH ₂ O	至50 µl	至25 µl	至20 µl	—

*引物终浓度为300 nM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200-500 nM范围内调整。

△ 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; 若模板量较低等因素导致扩增效果不佳, 可使用三步法程序进行PCR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	1 min	预变性	否
PCR 反应	40×	95°C	5 sec	变性	否
		60°C Δ 1	15 sec Δ 2	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	1 min	预变性	否
PCR 反应	40×	95°C	5 sec	变性	否
		50-60°C Δ 3	10 sec	退火	否
		72°C	15 sec Δ 2	延伸	是
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)					

Δ 1 请先使用60°C 15 sec进行扩增。如果需要进一步优化, 可以尝试在56-66°C 范围内进行。

Δ 2 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ABI 7700/7900HT/7500 Fast, Roche, BioRad和Agilent等公司荧光定量PCR仪时请设定在15 sec。

使用ABI 7000和7300时请设定在31 sec。

使用ABI7500时请设定在32 sec。

Δ 3 通常引物退火温度比引物的解链温度 (T_m) 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。

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。

<3> Real-Time PCR反应举例(PCR仪选用ABI 7500 Fast):

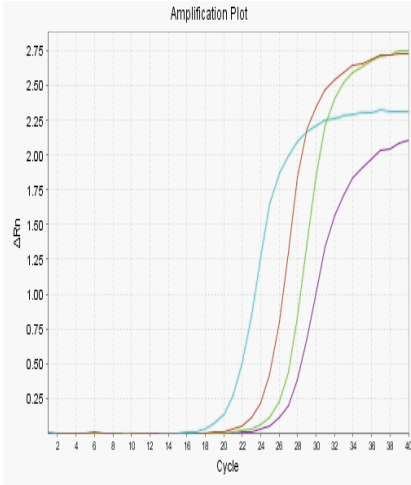


图1 扩增曲线

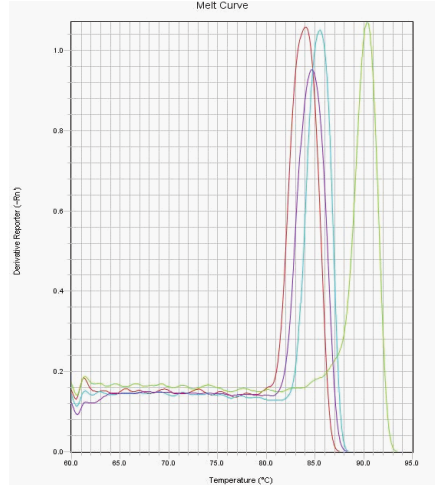


图2 溶解曲线

图1：4对不同检测体系以单链cDNA为模板，利用FastFire qPCR PreMix（Cat#FP207）

经qPCR测试后，通过图2溶解曲线分析，均为单一峰，未发现非特异性扩增和引物二聚体产生。cDNA合成是使用FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒（Cat#KR106）进行。

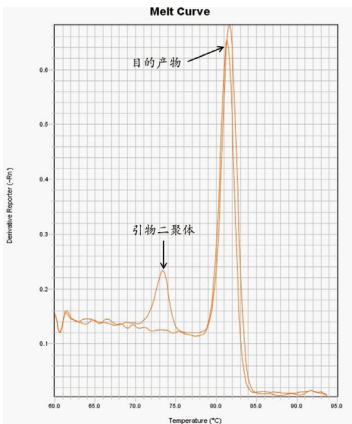


图3 溶解曲线分析

图3中使用FastFire qPCR PreMix的溶解曲线仅有单一峰，为特异性扩增产物，其T_m值为83.5°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-PCR反应时，有三种cDNA第一链合成试剂盒可以选择，分别是FastQuant RT Kit(with gDNase) (KR106)，Quant cDNA第一链合成试剂盒(KR103)，和TIANScript cDNA第一链合成试剂盒 (KR104)。

FastQuant RT Kit (with gDNase) (KR106) 可3 min去除基因组DNA的残留，使基因定量结果更加真实可信，适用于模板量为50 ng-2 μg的总RNA的快速反转录（共需21 min），是荧光定量PCR的反转录实验的最佳选择。

1. 将模板RNA在冰上解冻；5×gDNA Buffer、FQ-RT Primer Mix、10×Fast RT Buffer、RNase-Free ddH₂O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。

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 ₂ O	补足到10 μl

3. 按照表2的反转录反应体系配制混合液。

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 ₂ O	补足到10 μl

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15min。

6. 95℃，孵育3min之后放于冰上，得到的cDNA可用于后续荧光定量PCR反应或低温保存。

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 ²⁺ 浓度不合适	使用FastFire qPCR PreMix时，PCR反应体系中Mg ²⁺ 的终浓度为2 mM。对有些扩增体系，可以将Mg ²⁺ 终浓度提高到5 mM。进行Mg ²⁺ 终浓度优化时，建议每次增加0.5 mM Mg ²⁺ 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。
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 ²⁺ 浓度不合适	使用FastFire qPCR PreMix的反应体系含有Mg ²⁺ 的终浓度为2 mM。对有些扩增体系，可以将Mg ²⁺ 终浓度增加到5 mM。建议每次增加0.5 mM Mg ²⁺ 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。