



All-in-One™ qPCR Mix

—实时荧光定量 PCR 检测试剂

Cat.No.AOPR-0200 (20 μ l \times 200 reactions)

Cat.No.AOPR-0600 (20 μ l \times 600 reactions)

Cat.No.AOPR-1200 (20 μ l \times 1200 reactions)

Cat.No.AOPR-1000 (20 μ l \times 1000 reactions)

Cat.No.AOPR-4000 (20 μ l \times 4000 reactions)

GeneCopia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
翔泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼

邮编: 510663

电话: 4006-020-200

邮箱: sales@igenebio.com

网址: www.genecopia.com

www.igenebio.com

使用手册

All-in-One™ qPCR Mix

- I. 产品介绍
- II. 相关产品
- III. 试剂盒组份
- IV. 实验前准备
- V. 实验步骤
- VI. 实验案例
- VII. 查错指南
- VIII. 使用许可与质量保证

I. 产品介绍

All-in-One™ qPCR Mix 是一种基于 SYBR® Green 方法的 real-time quantitative PCR 检测试剂，可对目标 cDNA 进行快速、特异性的定量检测。本产品是一种即用型预混液，包含了一种高保真的热启动 DNA 聚合酶、优化的预混反应液和高质量的 dNTPs，可实现对低拷贝基因及 miRNA 的特异性、灵敏的 real-time quantitative PCR 检测。The All-in-One™ qPCR Mix 提供了一种通用的反应条件及实验操作流程，适用于大多数的引物扩增及荧光定量 PCR 仪。

II. 相关产品

GeneCopoeia 提供一套用于基因功能研究的完整解决方案，其相关产品如下表所示。

产品	描述
All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit	用于将 mRNA 逆转录成第一链 cDNA
All-in-One™ qPCR Primers	高特异、高灵敏度的基因特异验证引物
ExProfile™ Gene qPCR Arrays	预制和定制的基因表达量定量检测阵列
All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit	用于将 miRNA 逆转录成第一链 cDNA
All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kits	基于 SYBR Green 染料的实时定量 PCR 试剂
All-in-One™ miRNA qPCR Primers	高特异、高灵敏度的 miRNA 特异验证引物
miProfile™ miRNA qPCR Arrays	预制和定制的 miRNA 表达量定量检测阵列
RNAzol® RT RNA Isolation Reagent	用于分离 mRNA, microRNA 或 total RNA

III. 试剂盒组份

All-in-One™ qPCR Mix (Cat. Nos. AOPR-0200, AOPR-0600, AOPR-1200, AOPR-1000, AOPR-4000) 试剂盒组份如下表所示。

组份	体积	储存条件
2×All-in-One™ qPCR Mix	2×1 ml 3×(2×1 ml) 6×(2×1 ml) 5×(2×1 ml) 20×(2×1 ml)	-20°C 至少保存 12 个月，请注意避免反复冻融
ROX Reference Dye (30μM)	1×80 μl 3×(1×80 μl) 6×(1×80 μl) 5×(1×80 μl) 20×(1×80 μl)	-20°C 至少保存 12 个月，请注意避免反复冻融

IV. 实验前准备

注意！在处理化学制品前，请穿戴实验服、一次性手套和护目镜。

注意事项:

1. 为保证使用效果，试剂盒保存于-20 °C，避免储存或放置于 4°C 或室温条件下。注意避光保存。
2. 轻柔颠倒离心管数次以使试剂混合均匀，避免产生泡沫，短暂离心后备用。
3. 尽量使用无菌的蒸馏水。
4. 严格按照推荐的实验流程进行操作，避免核酸污染引起的非特异扩增。
5. All-in-One™ qPCR Mix 与 miProfile™ miRNA qPCR Arrays 或 All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit for miRNA expression profiling 配套使用时，请按照 the miProfile™ miRNA qPCR array 使用说明书进行实验设计。

V. 实验步骤

1. 解冻并轻柔混匀试剂盒中的 All-in-One™ qPCR Mix。短暂离心使管中试剂集中于底部，冰上保存。根据定量 PCR 仪器需求，选择是否使用 50×ROX Reference Dye。
2. 按照下表内容，在冰上准备 qPCR 反应液。

试剂	体积	终浓度
2×All-in-One™ qPCR Mix ^a	10 μl	1×
PCR forward primer (2 μM) ^b	2 μl	0.2 μM
PCR reverse primer (2 μM)	2 μl	0.2 μM
Template ^c	2 μl	
ROX Reference Dye ^d (30μM) if needed	0.4 -0.1μl	600nM~150nM
Water (double distilled)		
■ Not using ROX Reference Dye	4 μl	
■ Using ROX Reference Dye	3.6-3.9μl	
总体积	20 μl	

- a. 使用 2×All-in-One™ qPCR Mix 一半的体积时，需要相应地减半其他组份的体积。如果总的 qPCR 反应体系发生变化，对应的反应体系中各试剂体积需要做相同比例的调整。
- b. qPCR 引物反应终浓度一般介于 0.2 ~0.6 μM 之间。通常 PCR 反应体系中引物的终浓度为 0.2 μM 时，可以获得比较好的实验结果。如果 qPCR 扩增效率比较低，可以适当地提供引物使用浓度，但是过高的引物浓度可能会降低 qPCR 扩增特异性。从 GeneCopia 购买的引物已经经过实验验证，可以获得特异性好、灵敏度高的扩增结果。
- c. 在进行 qPCR 反应之前，逆转录得到的第一链 cDNA 需要进行稀释，避免逆转录体系中残余的一些试剂对 qPCR 扩增效率产生影响。通常，一个 qPCR 反应中的 DNA 模板量应少于 100ng，因为不同的 DNA 模板中靶基因的拷贝数不一样，有必要对不同的 DNA 模板进行梯度稀释来优化最佳的 DNA 模板使用量。
- d. ROX Reference Dye 可用于需要 Dye 的定量 PCR 扩增仪，是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。例如使用 Life Technologies 公司的 Real Time PCR 扩增仪进行实验就需要校正。不同的定量 PCR 仪使用的 ROX Reference Dye 浓度不同，因此，根据不同的定量 PCR 仪器，选择使用不同浓度的 ROX Reference Dye。常见的定量 PCR 仪，使用 ROX Reference Dye 参考如下：

仪器类型	ROX 使用量 (20µl 体系)	终浓度
BioRad iCycler, MyiQ, iQ5, CFX-96, CFX-384, Eppendorf Mastercycler realplex, Roche LightCycler 480, LightCycler 2.0	None	No ROX
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT and 7900HTFast, ABI Step One, ABI Step One Plus	0.4 µl (0.2-0.4µl)	600 nM (300-600nM)
ABI 7500, 7500 Fast, ABI Viiia7, Stratagene Mx3000P, Mx3005P, Mx4000,	0.1 µl (0.02-0.1µl)	150 nM (30-150nM)

注：其他未列在上表中的定量 PCR 仪器类型，请根据仪器的使用说明书摸索合适的 ROX Reference Dye。

- 轻柔混匀 qPCR 预混液并短暂离心，按照反应体系说明将预混液加入 PCR 反应管中，短暂离心确保预混反应液处于 PCR 反应管底部。
- 根据下表设置三步法 PCR 程序开始 qPCR 反应（以 Bio-Rad iQ5 定量 PCR 仪器推荐的反应程序为例）。

循环数	步骤	温度	时间	检测与否
1	预变性	95°C	10 min	否
40	变性	95°C	10 sec	否
	退火	55°C~60°C	20 sec	否
	延伸	72°C	15 sec	是

注意事项

- 本试剂盒使用 SYBR Green 染料监测 qPCR 反应，因此需要在 qPCR 循环结束后立即进行熔解曲线分析。请参照不同的定量 PCR 仪器，选择合适的熔解曲线分析反应程序。以下以 Bio-Rad iQ5 定量 PCR 仪器推荐的反应程序为例。

温度范围	热比	恒定温度	检测与否
72–95°C	0.5°C/单位时间	6 sec/单位时间	是
25°C		30 sec	否

- ii. 2×All-in-One™ qPCR Mix 中使用的 DNA 聚合酶是一种经过特异性化学修饰的热启动酶，95°C 预变性 10 分钟能够充分活化这种酶。
- iii. 通常情况下使用的退火温度可以在 55°C~60°C 温度范围内进行调整，但是最佳的退火温度也有可能超出这个温度范围，请根据实际情况选取最佳的退火温度进行 qPCR 实验。
- iv. qPCR 扩增产物的 DNA 片段长度一般为 80~150bp 之间，个别情况下扩增产物的 DNA 片段长度达到 300bp 也是可以接受的。
- v. 以上的反应条件主要参考 Bio-Rad iQ5 定量 PCR 仪器进行设置，若使用其他的定量 PCR 仪，请参考对应的仪器使用说明书来设置具体的延伸时间及熔解曲线分析反应程序。

VI. 实验案例

案例：使用 2×All-in-One™ qPCR Mix 对系列梯度稀释的标准质粒模板 DNA 进行扩增特异性和扩增灵敏性分析。扩增产物大小为 102 bp。实验仪器为 Bio-Rad iQ5 定量 PCR 仪。

实验过程：

1. 将质粒 DNA 进行系列稀释，共 6 个梯度浓度，浓度范围为 $10^5 \sim 1$ 拷贝/ μl 。
2. 按照如下表格所示，冰上配制 qPCR 反应体系。

试剂	体积
2×All-in-One qPCR Mix	10 μl
PCR forward primer (2 μM)	2 μl
PCR reverse primer (2 μM)	2 μl
ddH ₂ O	1 μl
总体积	15 μl

3. 轻柔混匀 qPCR 预混液，并短暂离心。
4. 每个 PCR 反应孔中分别加入 5 μl 梯度稀释的质粒 DNA，使用 5 μl ddH₂O 作为阴性对照。
5. 根据下表设置三步法 PCR 程序，开始 qPCR 反应。

循环	步骤	温度	时间	检测与否
1	预变性	95°C	10 min	否
45	变性	95°C	10 sec	否
	退火	60°C	20 sec	否
	延伸	72°C	15 sec	是
	熔解曲线分析	72°C~95°C	Heating Rate 0.5°C / 6 sec	是
	保温	25°C	30 sec	否

6. qPCR 结果分析：扩增曲线、熔解曲线分析。

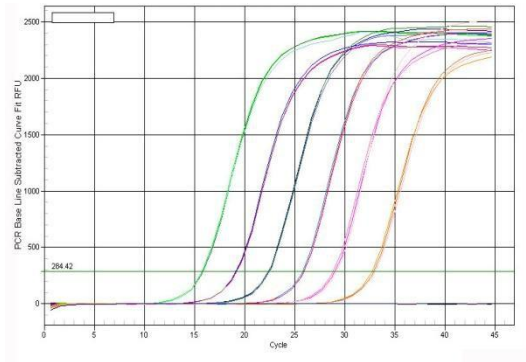


图 1：质粒 DNA 扩增曲线示意图

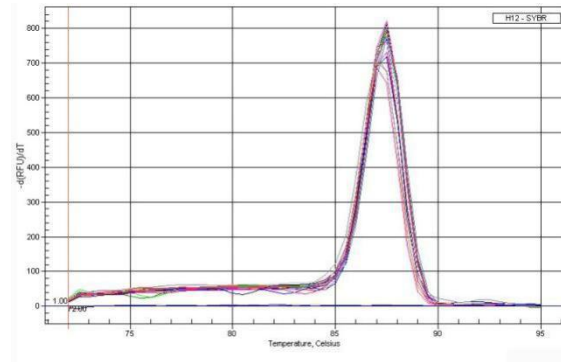


图 2：质粒 DNA 扩增产物的熔解曲线示意图

7. qPCR 结果分析：标准曲线分析。

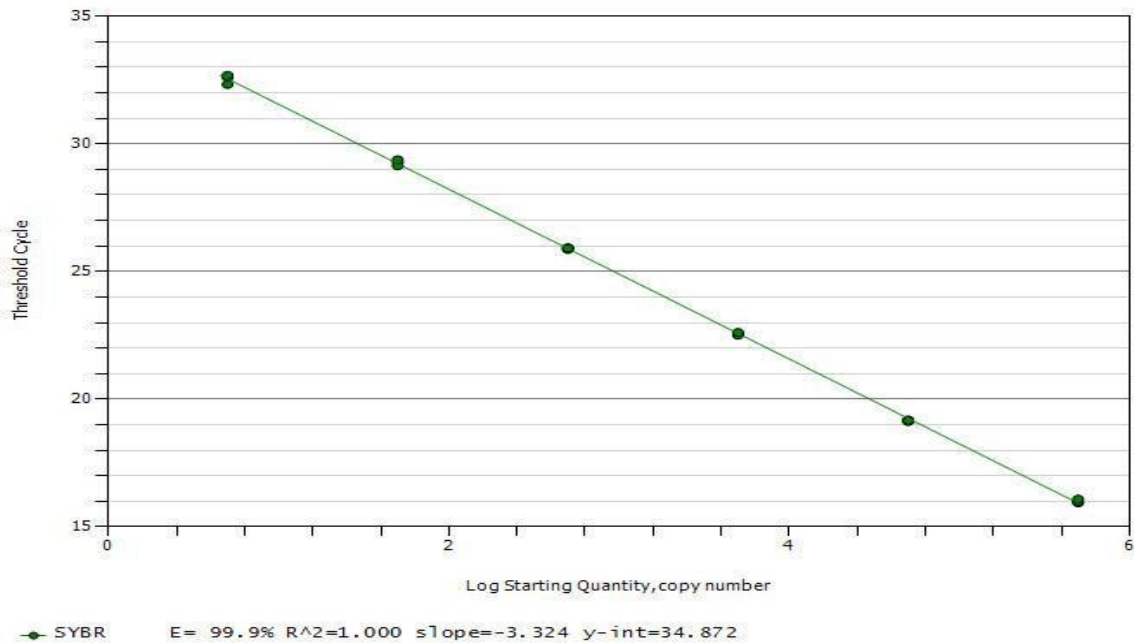


图 3：系列稀释的质粒 DNA 扩增标准曲线示意图

8. **结论：**以质粒 DNA 为模板，使用 All-in-One™ qPCR Mix 试剂产品进行扩增灵敏性检测，通过分析扩增产物的熔解曲线及扩增曲线，All-in-One™ qPCR Mix 可以检测低至 5 个拷贝分子的质粒 DNA。结合标准曲线良好的线性关系 ($R^2 > 99.9\%$) 进行分析，说明使用 All-in-One™ qPCR Mix 进行的 qPCR 扩增反应具有较高的扩增效率。

VII. 查错指南

<p>异常的扩增曲线 或 qPCR 反应结果</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 请确保预变性时间设置为 10 分钟，All-in-One™ qPCR Mix 中的热启动酶需要足够的时间进行激活，可以避免非特异扩增与引物二聚体的产生。 • 荧光检测温度可能设置不当，请做正确的调整。一般情况下，荧光检测设置在 qPCR 循环中引物延伸阶段。 • qPCR 仪器的反应孔位置可能与实际样品摆放位置设置不一致，导致读不到荧光信号值。 • qPCR 反应条件、引物浓度和引物序列可能不合适，请重新调整引物浓度和退火温度。如果还不能正常工作，请重新设计引物。 • 样本纯度（DNA 或 RNA 模板）可能不够，请对样本进行纯化处理，如苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀。如果样本为 cDNA 模板，可以将 cDNA 做系列梯度稀释，通过生成标准曲线来分析扩增效率，以便判断 qPCR 反应中是否有杂质污染。 • 使用 3% 琼脂糖电泳对 qPCR 产物进一步分析。使用琼脂糖凝胶或 PAGE 电泳对 qPCR 引物的纯度进行分析。可以使用苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀的方法对 qPCR 引物进行纯化处理。
<p>异常的熔解曲线</p>	<p>未加模板的阴性对照孔 (No Template Control) 检测到荧光信号。</p> <ul style="list-style-type: none"> • 如果阴性对照孔的 Ct 与阳性对照孔的 Ct 一样，很可能是污染了阳性模板，如果这种情况一直存在，请考虑更换新的 PCR 级反应水、引物及 2×All-in-One™ qPCR Mix。 • 如果空白对照的熔解曲线 Tm 值低于阳性对照的熔解曲线 Tm 值，可能是 PCR 扩增反应中产生了非特异扩增，比如引物二聚体。请重新在冰上准备 PCR 反应预混液，提高 PCR 扩增的退火温度。如果阴性对照的扩增 Ct 值大于 35，与阳性对照的 Ct 差异大于 5，则 PCR 反应体系已经达到其合格的标准。相反如果 Ct 不能达到前面提到的范围，那么需要重新设计引物或者优化反应条件。 <p>阳性对照孔熔解曲线出现双峰或多峰。</p> <ul style="list-style-type: none"> • 阳性对照反应体系中没有其他的引物存在出现了双峰或多峰，说明 PCR 扩增产生了非特异扩增产物。请重新在冰上准备 PCR 反应预混液，优化 PCR 反应条件，比如提高退火温度、降低引物浓度，或者提高荧光信号收集的温度（但不要超过目的产物熔解曲线 Tm 值）。如果问题仍存在，请考虑重新设计引物。

	<p>阳性对照孔熔解曲线异常的荧光信号或熔解曲线峰图。</p> <ul style="list-style-type: none">• 根据仪器设置需求调整合适的 ROX 的使用浓度。
<p>没有荧光信号 (Ct) 或者 Ct 值很高</p>	<ul style="list-style-type: none">• 检查是否有 PCR 产物生成（可以通过琼脂糖凝胶电泳检测），排除由于仪器检测器设置错误的可能。• 没有足够的 PCR 循环数。对于比较好的检测灵敏性，PCR 循环数最好设置到 35 个循环以上，但是超过 45 个循环数可能带来太多的背景信号。• 没有足够的 PCR 反应模板或者模板可能发生降解。建议采用高浓度的稀释模板重新进行 PCR 反应，同时避免反复冻融模板样本。• 扩增效率低、PCR 反应条件不合适。建议重新设计引物、优化反应条件。

VIII. 使用许可与质量保证

使用限制

以下条款适用于 All-in-One™ qPCR Mix 产品。若您不能接受这些条款，请在 5 个自然日内将产品完整退还给 GeneCopoeia。产品购买者需遵守最终用户限制许可条例。本产品仅限购买者内部研究使用，不得用于人体或诊断、治疗。未经 GeneCopoeia 事先书面同意，本产品不得转售，不得重新包装或修改后转售，不得用于生产商用产品。

质量保证

GeneCopoeia 保证产品与产品数据表中描述的规格保持一致。若经 GeneCopoeia 证实产品未达到规格要求，GeneCopoeia 将为您替换产品。若无法替换，GeneCopoeia 将退款给购买者。此质量保证仅适用于最初产品购买者。GeneCopoeia 仅负责替换产品或退还实际的购买金额。对于由使用或不正确使用产品产生的损害或使用其他相关材料和试剂产生的损耗，GeneCopoeia 不承担责任。GeneCopoeia 不提供任何形式的明示的或者默示的保证，包括对适销性、适用于特定用途的默示保证。

GeneCopoeia 致力于为消费者提供高质量的研究产品。如果您对 GeneCopoeia 的产品有任何问题或疑虑，请拨打电话 4006-020-200 联系我们。

© 2016, GeneCopoeia, Inc

GeneCopoeia, Inc.
9620 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850
Tel: 301-762-0888 Fax: 301-762-3888
Email: inquiry@genecopoeia.com
Web: www.genecopoeia.com

广州易锦生物技术有限公司
广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路 3 号
广州国际企业孵化器 F 区 8 楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
网址: www.genecopoeia.com (英文) www.igenebio.com (中文)