

产品说明书

产品名称: Fast Super EvaGreen[®] qPCR Master Mix

产品货号: BN12008

产品规格: 100T, 500T

产品内容

组分	100T	500T
A. 2 × Super EvaGreen Master Mix	1 mL	5 × 1 mL
B. 10 × ROX reference dye	0.5 mL	1 mL

组分 A 包含 Super EvaGreen[®] dye, dNTP, PCR buffer (含 Tris 和 MgCl₂), 热启动 Taq 聚合酶; 组分 B 是 10 × ROX 参照染料。

产品参数

$\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 500/530 \text{ nm}$ (结合 DNA)

$\lambda_{\text{abs}} = 471 \text{ nm}$ (未结合 DNA)

储存条件

长期保存请在 -20°C 避光保存, 解冻后在 4°C 避光条件下可以储存 6 个月。使用前, 将产品室温下解冻, 并轻轻涡旋混匀, 解冻后所有实验应在冰上操作。该产品可以重新冷冻储存。

产品介绍

Fast Super EvaGreen[®] qPCR Master Mix 是一款用于实时定量 PCR 的即用型试剂盒。其中 Super EvaGreen[®] 是一种新型的专门为 qPCR 和高分辨率溶解曲线分析设计的 DNA 结合染料, 它通过一种“按需求释放”的机制, 极大地降低了对 PCR 扩增的抑制性。

Fast Super EvaGreen[®] qPCR Master Mix 包含一种化学修饰的热启动 Taq DNA 多聚酶。这种 Taq 酶 2 min 内可以被完全激活, 尤其适用于快速 PCR 反应。此外, 这种 Taq DNA 多聚酶在室温下没有活性, 不会对 DNA 造成污染, 性

能远远优于市面上抗体修饰的热启动酶。

Super EvaGreen[®] 的另一个优点是它的安全性。常规的 DNA 结合染料存在潜在的致突变性。基于这方面考虑, 我们研发设计了 Super EvaGreen[®] 染料, 它不能透过细胞膜, 因而不能与活细胞的基因组 DNA 结合, 确保了其安全性。然而, 其他所有的商业性 PCR 荧光染料都可以在几分钟内进入细胞, 例如 SYBR Green I, 是一种众所周知的环境毒性比溴化乙锭 (EB) 还要大的诱变剂。

此外, 我们公司的 Super EvaGreen[®] Master Mix 还有一个性能也十分卓越, 即它的 PCR 产物可以直接用于凝胶电泳检测, 不需要额外添加任何核酸染料。试剂盒中的 Super EvaGreen 可以作为 DNA 预染的核酸染料, 电泳后可以直接用于观察 DNA 条带。

使用方法

一. 实验参考因素

1. qPCR 仪器: 对于 iCycler 的用户, 不需要在 PCR Mix 里面额外添加 FAM。由于 EvaGreen[®] 有轻微的背景荧光, 它可以作为充足且稳定的校准基线来使用。对于 Roche Light Cycler 的用户, 如果使用玻璃毛细管进行反应, 那么需要在反应体系中额外加入 BSA (终浓度 ~0.5 mg/mL); 如果使用透明的塑料毛细管, 则不需要添加 BSA。

2. 溶解曲线分析仪器: Rotor-Gene 6000, ABI 7500 FAST, HR1[™], 384-well LightScanner[™], Roche LightCycler 480, Rotor-Gene 6000, ABI 7500 FAST 和 Roche LightCycler 480 等仪器都可以用于 qPCR 和溶解曲线的分析。具体参照仪器生产商的使用说明进行数据的采集和分析操作。

3. ΔR 和 ΔR_N : 当比较众多 qPCR Master Mix 产生的荧光信号强度时, 需要注意比较的方法。通常 ΔR 是高于基线水平的荧光增量。一般来说, 10 μ L 的 1 \times Fast Super EvaGreen[®] 反应体系与 50 μ L ABI 公司的 1 \times PowerSYBR 或 Invitrogen 公司的 1 \times SYBR Green I 相比, 可以产生更高的 ΔR 。 ΔR_N 定义为 ΔR 除以 ROX 值。因此高浓度的 ROX 可以产生更低的 ΔR_N 。当 ROX 被 ABI 7500, iCycler IQ, MJ opticon, MJ Chromo4, MX3000 或 MX4000 仪器最大激发时, ΔR_N 会更小。因此, 应用于商业 SYBR Green Master Mix 的较低浓度的 ROX 往往会产生更高的 ΔR_N 。

4. 预期的动力学曲线: 根据对比实验我们发现, Fast Super EvaGreen[®] Master Mix 的 PCR 扩增曲线与 SYBR Green I 的 Master Mix 相比, 其灵敏度和稳定性更高。由于 SYBR 染料对 DNA 扩增的抑制性影响, 基于 SYBR 染料的 Master Mix 在 PCR 达到 Ct 阈值后通常会延迟扩增 5-7 个循环数。相比较而言, Fast Super EvaGreen[®] Master Mix 可以使 PCR 持续扩增至 50 个循环。

5. Ct 值: 在相同 PCR 反应条件下, 使用 Super EvaGreen[®] 和 SYBR Green I 进行的 qPCR 反应, 其 Ct 值相对误差在 +1 或 -1 之间。

6. 扩增片段长度: 为了使 Super EvaGreen[®] Master Mix 的扩增效率达到最佳, 推荐的 DNA 扩增长度为 50-200 bp, 如果需要扩增更长的 DNA 片段, 那么需要适当延长 PCR 的反应时间。

7. 凝胶电泳分析 PCR 扩增产物: 当使用 Super EvaGreen[®] Master Mix 进行 PCR 扩增反应后, 如需进行 DNA 凝胶电泳分析, 只要在 PCR 反应溶液中加入 DNA loading buffer, 按常规程序上样, 跑电泳, 不需要在制胶时额外添加核酸染料。使用 254 nm UV 激发器、凝胶成像仪, 或 SYBR Green 滤光器可以直接观察凝胶。另外, 凝胶也可以用 488nm 的激光凝胶扫描仪进行观察。

二、PCR 反应体系

每管反应组分如下表所示:

反应组分	20 μ L 反应体系	终浓度
2 \times Fast Super EvaGreen [®] Master Mix	10 μ L	1 \times
F, R 引物	\times μ L	各 0.1-0.5 μ M
模板	\times μ L (见注 1 & 2)	见注 3
10 \times ROX	适量	见注 4 & 表 1
H ₂ O	补足至 20 μ L	

1. cDNA 模板: Super EvaGreen[®] Master Mix 适用于 mRNA 的定量分析。第一步通过逆转录将 mRNA 转录成 cDNA, 第二步利用 Super EvaGreen[®] kit 进行 cDNA 的定量扩增。为了确保扩增效率, cDNA 样品的体积不要超过总反应体积的 10%。为了精确定量转录水平, 我们推荐使用 no-RT 的对照样品, 以排除可能的基因组 DNA 的污染。

2. 一步法 RT-qPCR 用于 mRNA 的定量分析。首先引物设计时要尽量避免形成引物二聚体。我们建议合理优化逆转录酶的使用量和逆转录过程的持续时间。耐热的逆转录酶可以兼容 Agilent, Fermentas, Lucigen 和 Life Technologies 等各种仪器。如果可以, 设计的引物 Tm 值尽量在 55 $^{\circ}$ C 左右, 逆转录及后续扩增反应也应在 55 $^{\circ}$ C。为精确定量转录水平, 我们推荐使用 no-RT 的对照样品, 以排除有可能的基因组 DNA 的污染。

3. 模板浓度: DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同, 必要时可进行梯度稀释, 确定合适的 DNA 模板添加量。cDNA 作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

4. 参照染料 ROX: 对于某些固定型号的仪器, 必须添加 ROX 才能精确测定 Ct 值。ROX 的使用浓度可以参照表 1 (见第 4 页)。ROX 会给熔解曲线分析造成一定的背景干扰。因此, 为了避免 ROX 杂峰干扰, 在应用软件的“Passive Reference Dye”中不要选择检测 ROX 荧光值选项, 然后再进行数据的收集与分析。

三、反应程序设置

您可以根据扩增模板的性质和仪器的功能,选择以下三个程序之一进行实验。

A. 两步快速扩增法

这个程序适用于大多数引物 T_m 为 60°C 的扩增,溶解曲线遵循您所用仪器提供的标准流程执行。

程序	温度	时间	循环
酶激活	95°C	2 min	1
变性	95°C	5 s (见注 5)	45
退火&延伸	60°C	30 s	

注意事项

5. 变性时间: 如果扩增片段较短,变性时间可以低于 5 s,甚至可以低至 0 s。当变性时间设置为“0”时,它仅仅意味着温度增加到 96°C ,然后没有停留迅速降温。设置时间 5 s 可以确保 DNA 较长片段和高 GC 片段的变性。高性能的仪器会进一步增加扩增子变性的可靠性。

B. 三步扩增法

这个程序适用于扩增温度比退火温度高的实验。例如,如果扩增片段有相对较长的引物,容易产生非特异性的扩增,在更高的温度下进行延伸可以降低非特异性扩增。溶解曲线遵循您所用仪器提供的标准流程执行。

程序	温度	时间	循环
酶激活	95°C	2 min	1
变性	95°C	5 s	45
退火	$50-60^\circ\text{C}$	5 s (见注 6)	
延伸	72°C	25 s (见注 7)	

注意事项

6. 退火温度: 退火温度应根据引物 T_m 值设定,通常是 $50-60^\circ\text{C}$ 为佳。不过,引物 T_m 值(和扩增温度)应该设计尽可能地接近 60°C (但仍在 $50-60^\circ\text{C}$ 范围内),减少退火和变性温度之间的差距。这样温度增加所需时间更少,进而扩增效率更高。

7. 扩增温度: 扩增温度设定在 72°C 对于大多数扩增子通常效率更高。然而对于富含 AT 的扩增片段 (> 70%) 或含有

AT 富集补丁的扩增子, 60°C 延长通常可以获得更好的结果。

C. 通用程序

此程序适用于几乎所有 qPCR 仪器,也适用于使用快速扩增法无法达到较好效果的扩增子。

程序	温度	时间	循环
酶激活	95°C	2 min	1
变性	95°C	15 s	45
退火&延伸	60°C	60 s	

Super EvaGreen 染料特性

光谱特性

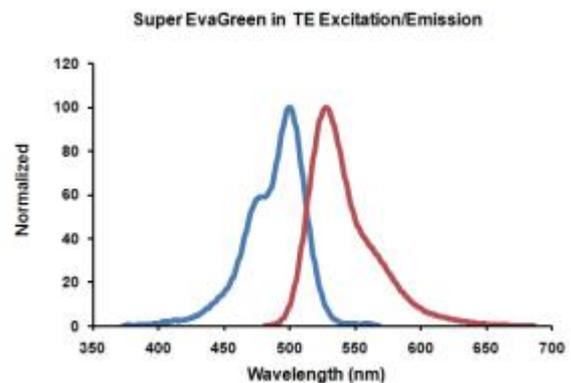


图 1. 在 TE 缓冲液中,结合到双链 DNA 中的 Super EvaGreen 染料的激发光谱(左图)和发射光谱(右图)。

SYBR Green I 与 Super EvaGreen® 荧光染料的稳定性比较

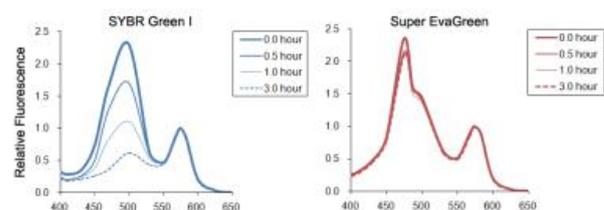


图 2. Super EvaGreen®、SYBR Green I 的吸收光谱 $1.2\mu\text{M}$, $\text{pH} 9$ 的 Tris 缓冲液中, 99°C 孵育 3 小时后,两种荧光染料溶液的相对荧光强度, ROX 作参照物

Super EvaGreen[®]染料特性

染料的稳定性

Ames 实验显示, Super EvaGreen[®]染料没有细胞毒性和致突变性, 该染料不具细胞膜渗透性 (图 3), 这是其低细胞毒性的一个关键因素。相反地, 众所周知, SYBR Green I 荧光染料具有很强的致突变性, 可能原因是其抑制了细胞内 DNA 修复机制 (Ohta, etel. Mutat. Res.492, 91(2001)), 而 SYBR Green I 较强的细胞毒性是由其较高的细胞膜渗透性所导致的 (图 3)。

Super EvaGreen[®]、SYBR Green I 荧光染料细胞膜渗透性比较

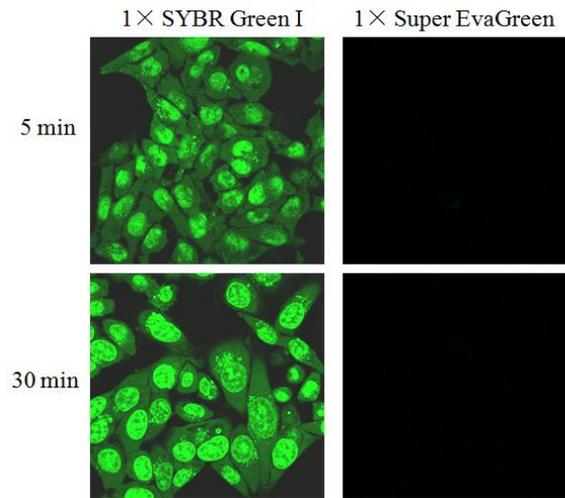


图 3. 37℃条件下, 用 SYBR Green I 或 Super EvaGreen[®] (1.2uM) 孵育 HeLa 细胞, 分别在 5 min 或 30 min 后拍照, 观察荧光强度。SYBR Green I 迅速渗透进入细胞, 然而 Super EvaGreen[®]几乎不具有细胞膜渗透性。

表 1、根据 PCR 仪种类不同, 推荐 ROX 使用浓度

PCR Instrument	推荐 ROX 使用浓度	使用量 (20uL 体系)
BioRad: iCycler, MyiQ, MiQ 2, iQ 5, CFX-96, CFX-384, MJ Opticon, Option2, Chromo4, MiniOpticon Qiagen: Roto-Gene Q, Roto-Gene3000, Roto-Gene 6000 Eppendorf: Mastercycler realplex Illumina: Eco RealTime PCR System Cepheid: SmartCycler Roche: LightCycler 480, 96, LightCycler 2.0	No ROX	None
ABI: 7500, 7500 Fast, ViiA 7 Stratagene: MX4000P, MX3000P, MX3005P, QuantStudio, Illumina Eco, Thmorgan Q6, Q4	Low ROX 0.05~0.1× (终浓度)	按 1:10 稀释 10×ROX; 添加 1~2uL 稀释后的 1×ROX 至最终反应体系
ABI: 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOne plus	High ROX 1×(终浓度)	添加 2uL 10×ROX 至最终反应体系