



中文操作手册

GoTaq® qPCR Master Mix

Cat. # A6001, A6002

A stylized, light-colored line drawing of a dragonfly, positioned diagonally across the bottom left of the page.

www.promega.com

目录

1. 产品描述	2
2. 产品组分及储存条件	3
3. 一般注意事项	4
3.A 光谱特性	4
3.B MgCl ₂ 浓度	4
3.C 兼容仪器	4
4. GoTaq® qPCR Master Mix 操作步骤	5
4.A 应用 ABI PRISM® 7500/7500 Fast/7900HT Real-Time PCR System 的操作方法	6
4.B 应用 Bio-Rad iQ5 Optical System 的操作方法	7
4.C 应用 Roche LightCycler 480 Real Time PCR 扩增仪的操作方法	8
4.D 应用 Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR 扩增仪的操作方法	10
5 附录	11
5.A 快速操作指南	12
5.B RT-qPCR 实验方法	13
5.C 实验条件的优化	15
5.D 引物设计及使用说明	16
5.E Real Time PCR 数据分析	17
5.F 相对定量 vs 绝对定量	18
5.G 常见问题	20
5.H 相关产品	21

1. 产品描述

GoTaq® qPCR Master Mix 是采用染料法进行 Real Time PCR 的专用试剂。本产品采用一种新的**专利荧光染料 BRYT Green® dye**，此染料与双链 DNA 特异性结合后，会发出比 SYBR® Green I 更强的荧光信号。用于基因定量，尤其适合低拷贝基因的检测。

GoTaq® qPCR Master Mix 产品提供易用的、2X 的预混液。本产品中已包含：专利的双链 DNA 结合染料 BRYT Green® dye，低浓度的 CXR (carboxy-X-rhodamine) 参比荧光染料（性质与 ROX 相同），GoTaq® 热启动酶，MgCl₂，dNTP 和专利的反应缓冲液。另外独立包装的 100X CXR 用于需要高浓度参比荧光染料的仪器。

GoTaq® qPCR Master Mix 的优点

染料：与 SYBR® Green I 染料相比，GoTaq® qPCR Master Mix 专利染料 **BRYT Green® dye** 结合双链 DNA 后对 PCR 反应无抑制作用，发出的荧光更强。可以让样品的 C_T 值更早出现，线性范围更广。BRYT Green® dye 与参比荧光染料 CXR 的激发和发射波长分别与 SYBR® Green I 和 ROX 相近。在实验过程中采用与 SYBR® Green I 和 ROX 完全相同的设置。

DNA 聚合酶/缓冲液配方：GoTaq® 热启动酶采用专利的抗 Taq 酶抗体，在室温时阻断 Taq 酶的活性。当在 95°C 加热 2 分钟时，酶活性被完全激活。专利的酶/缓冲液配方，能**耐受更多的循环数（45-50 个循环）**，并且与需要**较长预变性时间**的热循环程序（95°C，10min）兼容。对**GC 含量较高（60%以上）**的 DNA 片段或 DNA 模板中有 PCR 反应抑制剂存在时，此缓冲液配方也能保证扩增顺利进行。

GoTaq® qPCR Master Mix 系统提供最小的批间差异，在宽广的线性范围内保证高效、敏感的扩增。

2. 产品组分及储存条件

Product	Size (50μl 反应体系)	Cat.#
GoTaq [®] qPCR Master Mix	200 反应	A6001
包含:		
5 × 1ml	GoTaq [®] qPCR Master Mix, 2X	
100 μ l	100X CXR Reference Dye	
2 × 13ml	Nuclease-Free Water	

Product	Size (50μl 反应体系)	Cat.#
GoTaq [®] qPCR Master Mix	1000 反应	A6002
包含:		
25 × 1ml	GoTaq [®] qPCR Master Mix, 2X	
5 × 100 μ l	100X CXR Reference Dye	
10 × 13ml	Nuclease-Free Water	

储存条件: GoTaq[®] qPCR Master Mix 采用-20℃运输。到货后, 将全部组分储存于-20℃, 避光保存。使用过程中, 所有组分可避光 2-8℃保存 3 个月。

3. 一般注意事项

3.A 光谱特性

GoTaq® qPCR Master Mix 采用的专利染料 BRYT Green® dye 具有与 SYBR® Green I 相似的光谱特性，激发波长：493nm，发射波长：530nm。CXR 参比荧光染料具有与 ROX™ 相同的光谱特性，激发波长：580nm，发射波长：602nm。采用 GoTaq® qPCR Master Mix 进行基因定量时使用与 SYBR® Green I 和 ROX 完全相同的设置。

3.B MgCl₂ 浓度

GoTaq® qPCR Master Mix 中的 MgCl₂ 浓度已进行优化以达到最佳表现。如需对镁离子浓度进行调整，请加入 PCR 级的高浓度镁离子储存液（目录号：A3511，A3513）。

3.C 兼容仪器

GoTaq® qPCR Master Mix 可用于任何能够检测 SYBR® Green I 或 FAM™ 染料的仪器。GoTaq® qPCR Master Mix 中已含有低浓度的 CXR 参比染料。对于以下仪器，可直接使用，无需再加入参比荧光染料：

- Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time PCR System
- Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System
- Bio-Rad DNA Engine Opticon® and Opticon® 2 Real Time PCR Detection Systems
- Bio-Rad/MJ Research Chromo4™ Real-Time Detector
- Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System
- Bio-Rad iCycler® iQ™ and iQ™ 5 Real-Time PCR Detection System
- Bio-Rad MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
- Cepheid SmartCycler® system
- Corbett Rotor-Gene™ 3000 and 6000 Real-Time Rotary Analyzer
- Eppendorf Mastercycler® ep realplex Real-Time PCR System
- Roche LightCycler® 480 Real-Time PCR System
- Stratagene Mx3000P® and Mx3005P® Real-Time PCR Systems
- Stratagene Mx4000® Multiplex Quantitative PCR System

对于 ABI 仪器中除 7500 和 7500 Fast 之外的型号，由于仪器本身的原因，需要高浓度的参比荧光染料，请加入 100×CXR 参比荧光染料至终浓度为 1×。包括以下型号：

- Applied Biosystems ABI PRISM® 7000 and 7700 Sequence Detection System
- Applied Biosystems 7300 and 7900HT Real-Time PCR System

- Applied Biosystems GeneAmp® 5700 Thermal Cycler
- Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems

4. GoTaq® qPCR Master Mix 操作步骤

本产品基于 BRYT Green® dye 染料法 Real Time PCR 进行基因定量。可直接替换其他基于 SYBR® Green I 的扩增试剂以得到更佳的扩增效果。为保证实验的均一性，请预先配制足够量的无模板反应混合液，用于标准管和样品管的扩增反应（大约每 20 个反应，在配制时需多配 1 个反应）。

以下步骤以 20µl 反应体系为例进行 PCR 扩增，如需增大或减小反应体积，请按比例增加或缩减各组分的用量。以下操作步骤中，DNA 模板的加入量占反应总体积的 10%（例如，18µl 反应混合液加入 2µl DNA 模板，总体积 20µl），如加入 DNA 模板量多于或少于 2µl，请按照总体积 20µl 调整 Nuclease-Free Water 的量。

由实验者提供的材料

- qPCR 引物，DNA 模板，阳性对照模板，标准品
 - 带滤芯枪头，无菌、无核酸酶离心管用于反应混合液的配制
 - 移液器、Real Time PCR 仪、离心机
 - 与 Real Time PCR 仪器配套的 96/384 孔板及封口膜
 - MgCl₂ 储存液（可选）
- 1) GoTaq® qPCR Master Mix 在室温融化后置于冰上，用前颠倒、吹打或轻微震荡混匀，用离心机轻微离心收集后使用，避免剧烈震荡，避免形成泡沫或长时间曝光；
 - 2) 配制不加模板的反应混合液，吹打或轻微震荡混匀，避免剧烈震荡，避免形成泡沫或长时间曝光。将反应混合液 18µl 分至各反应孔；
 - 3) 将稀释好的标准品 DNA 模板、样品 DNA 或 Nuclease-Free Water（用作阴性对照）各 2µl 分别加入对应的反应孔中，注意防止各样品间交叉污染；
 - 4) 反应板封口，轻微离心将所有的反应组分离心至管底，并去除气泡；
 - 5) 使用 Real Time PCR 扩增仪，按照以下通用的 PCR 程序进行 PCR 扩增反应（针对不同品牌及型号的 Real Time PCR 扩增仪，可参考后续内容；如需条件优化，可参考附录 5.C）：

Stage 1 预变性	1 cycle	95°C	2 min
Stage 2 热循环	40 Cycle	95°C	15 sec
		60°C	1 min
Stage 3 熔解曲线(Dissociation stage)			

对于不同品牌及型号的 Real Time PCR 扩增仪，可以参考以下的操作方法：

4.A 应用 ABI PRISM® 7500/7500 Fast/7900HT Real-Time PCR System 的操作方法

请按照仪器使用说明书并参考以下要求进行实验操作。

1) 按下表配制 PCR 反应混合液（反应液配制可在室温进行），并分至各反应管，然后加入 2 μ l*模板：

组分	体积（20 μ l 反应体系）	终浓度
Nuclease-Free Water	7 μ l	
上游引物（10 μ M）	0.4 μ l	0.2 μ M*
下游引物（10 μ M）	0.4 μ l	0.2 μ M*
GoTaq® qPCR Master Mix, 2X	10 μ l	1X
CXR 100X*	0.2 μ l	1X
总体积	18μl	

* DNA 模板的添加量通常在 100ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，DNA 模板的加入量需要调整；

如果待测目的基因含量较低，欲使用本制品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应时，如果第一步反转录反应采用的是 Promega 的 GoScript™ Reverse Transcription System (A5000)，cDNA 产物作为 DNA 模板时的添加量可以达到 PCR 反应体系总体积的 20%。通过多加入模板的方式，提高低拷贝基因检测的重复性；

如果待测目的基因含量较高，如内参基因 β -actin、GAPDH、18S 等，建议减少 DNA 模板加入量至 0.4-1 μ l，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的 DNA 模板添加量。

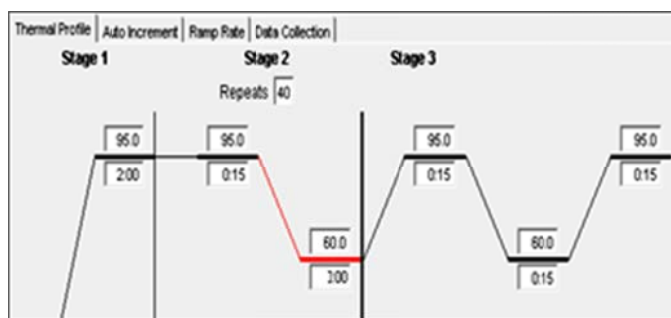
* 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可得到较好结果。可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。当出现非特异性反应或引物二聚体时，可尝试将引物浓度降至 0.05~0.1 μ M。

* ABI 仪器除 7500 和 7500 Fast 之外的型号需加入高浓度 CXR。对于 7500 和 7500 Fast，GoTaq® qPCR Master Mix 可直接使用，无需再加入 CXR 参比荧光染料。

2) 进行 Real Time PCR 反应：

建议采用下列图表显示的两步法 PCR 反应程序。如果使用的是 T_m 值较低的引物，两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应（见附录 5.C 实验条件的优化）。

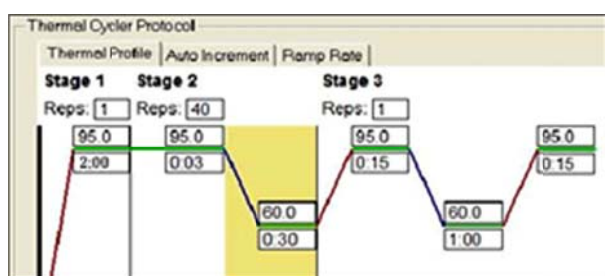
ABI PRISM[®] 7500/7900HT Real-Time PCR System 采用下列设置:



两步法 PCR 标准扩增程序:

Stage 1	预变性	1 cycle	95°C	2 min
Stage 2	热循环	40 Cycle	95°C	15 sec
			60°C	1 min
Stage 3	熔解曲线(Dissociation stage)			

ABI PRISM[®] 7500 Fast Real-Time PCR System 采用下列设置:



两步法快速 PCR 扩增程序:

Stage 1	预变性	1 cycle	95°C	2 min
Stage 2	热循环	40 Cycle	95°C	3 sec
			60°C	30 sec
Stage 3	熔解曲线(Dissociation stage)			

◆ 特别提示:

本产品中使用的GoTaq[®]热启动酶采用抗体法介导的热启动, 预变性95°C、2分钟可完全激活酶活性。同时GoTaq[®]热启动酶具有更强的热稳定性, 即使预变性时间延长至95°C、10分钟也不会降低酶活性, 并且能够耐受更多的循环数(45-50循环)。因此, 使用GoTaq[®] qPCR Master Mix进行实验, 可根据实验要求延长预变性时间和增加循环数。

3) 实验结果分析

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线, 进行绝对定量时制作标准曲线等(见附录 5.E Real Time PCR 数据分析)。

4.B 应用 Bio-Rad iQ5 Optical System 的操作方法

请按照仪器使用说明书并参考以下要求进行实验操作。

1) 按下表配制 PCR 反应混合液(反应液配制可在室温进行), 并分至各反应管, 然后加入 2μl*模板:

组分	体积 (20μl 反应体系)	终浓度
Nuclease-Free Water	7.2μl	
上游引物 (10μM)	0.4μl	0.2μM*
下游引物 (10μM)	0.4μl	0.2μM*
GoTaq [®] qPCR Master Mix, 2X	10μl	1X
总体积	18μl	

* DNA 模板的添加量通常在 100ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，DNA 模板的加入量需要调整；

如果待测目的基因含量较低，欲使用本产品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应时，如果第一步反转录反应采用的是 Promega 的 GoScript™ Reverse Transcription System (A5000)，cDNA 产物作为 DNA 模板时的添加量可以达到 PCR 反应体系总体积的 20%。通过多加入模板的方式，提高低拷贝基因检测的重复性；

如果待测目的基因含量较高，如内参基因 β -actin、GAPDH、18S 等，建议减少 DNA 模板加入量至 0.4-1 μ l，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的 DNA 模板添加量。

* 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可得到较好结果。可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。当出现非特异性反应或引物二聚体时，可尝试将引物浓度降至 0.05~0.1 μ M。

2) 进行 Real Time PCR 反应：

建议采用下列图表显示的两步法 PCR 反应程序。如果使用的是 T_m 值较低的引物，两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应（见附录 5.C 实验条件的优化）。

Options	Insert	Delete	Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint	PCR / Melt Data Acquisition	Temperature Change	End Temperature
...	+	X	1	1						
...	+	X			1	2:00	95.0			
...	+	X	2	40						
...	+	X			1	0:15	95.0			
...	+	X			2	1:00	60.0	Real Time		
...	+	X	3	1						
...	+	X			1	1:00	95.0			
...	+	X	4	1						
...	+	X			1	1:00	55.0			
...	+	X	5	81						
...	+	X			1	0:10	55.0	Melt Curve	0.5	95.0

Stage 1 预变性	1 cycle	95°C	2 min
Stage 2 热循环	40 Cycle	95°C	15 sec
		60°C	1 min
Stage 3 熔解曲线(Dissociation stage)			

◆特别提示：

本产品中使用的 GoTaq® 热启动酶采用抗体法介导的热启动，预变性 95°C、2 分钟可完全激活酶活性。同时 GoTaq® 热启动酶具有更强的热稳定性，即使预变性时间延长至 95°C、10 分钟也不会降低酶活性，并且能够耐受更多的循环数（45-50 循环）。因此，使用 GoTaq® qPCR Master Mix 进行实验，可根据实验要求延长预变性时间和增加循环数。

3) 实验结果分析

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行绝对定量时制作标准曲线等（见附录 5.E Real Time PCR 数据分析）。

4.C 应用 Roche LightCycler 480 Real Time PCR 扩增仪的操作方法

请按照仪器使用说明书并参考以下要求进行实验操作。

1) 按下表配制 PCR 反应混合液（反应液配制可在室温进行），并分至各反应管，然后加入 2 μ l*模板：

组分	体积 (20 μ l 反应体系)	终浓度
Nuclease-Free Water	7.2 μ l	
上游引物 (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M*
下游引物 (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M*
GoTaq [®] qPCR Master Mix, 2X	10 μ l	1X
总体积	18μl	

* DNA 模板的添加量通常在 100ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，DNA 模板的加入量需要调整；

如果待测目的基因含量较低，欲使用本制品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应时，如果第一步反转录反应采用的是 Promega 的 GoScript™ Reverse Transcription System (A5000)，cDNA 产物作为 DNA 模板时的添加量可以达到 PCR 反应体系总体积的 20%。通过多加入模板的方式，提高低拷贝基因检测的重复性；

如果待测目的基因含量较高，如内参基因 β -actin、GAPDH、18S 等，建议减少 DNA 模板加入量至 0.4-1 μ l，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的 DNA 模板添加量。

* 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可得到较好结果。可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。当出现非特异性反应或引物二聚体时，可尝试将引物浓度降至 0.05~0.1 μ M。

2) 进行 Real Time PCR 反应：

建议采用下列图表显示的两步法 PCR 反应程序。如果使用的是 Tm 值较低的引物，两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应（见附录 5.C 实验条件的优化）。

Programs							
Program Name	Cycles	Analysis Mode					
pre-denature	1	None					
Amplification	40	Quantification					
Melting Curve	1	Melting Curves					

Amplification Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:15	4.4		0	0	0
60	Single	00:01:00	2.2		0	0	0

两步法 PCR 标准扩增程序：

	循环数	温度	时间	Ramp Rate
Pre-denature	1 cycle	95°C	2 min	4.4°C/秒
Amplification	40 Cycle	95°C	15 sec	4.4°C/秒
		60°C	1 min	2.2°C/秒
Melting Curves (溶解曲线)				

◆特别提示：

本产品中使用的 GoTaq[®] 热启动酶采用抗体法介导的热启动，预变性 95°C、2 分钟可完全激活酶活性。同时 GoTaq[®] 热启动酶具有更强的热稳定性，即使预变性时间延长至 95°C、10 分钟也不会降低酶活性，并且能够耐受更多的循环数（45-50 循环）。因此，使用 GoTaq[®] qPCR Master Mix 进行实验，可根据实验要求延长预变性时间和增加循环数。

4) 实验结果分析

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行绝对定量时制作标准曲线等（见附录 5.E Real Time PCR 数据分析）。

4.D 应用 Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR 扩增仪的操作方法

请按照仪器使用说明书并参考以下要求进行实验操作。

- 1) 按下表配制 PCR 反应混合液（反应液配制可在室温进行），并分至各反应管，然后加入 2μl*模板：

组分	体积（20μl 反应体系）	终浓度
Nuclease-Free Water	7.2μl	
上游引物（10μM）	0.4μl	0.2μM*
下游引物（10μM）	0.4μl	0.2μM*
GoTaq® qPCR Master Mix, 2X	10μl	1X
总体积	18μl	

* DNA 模板的添加量通常在 100ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，DNA 模板的加入量需要调整；

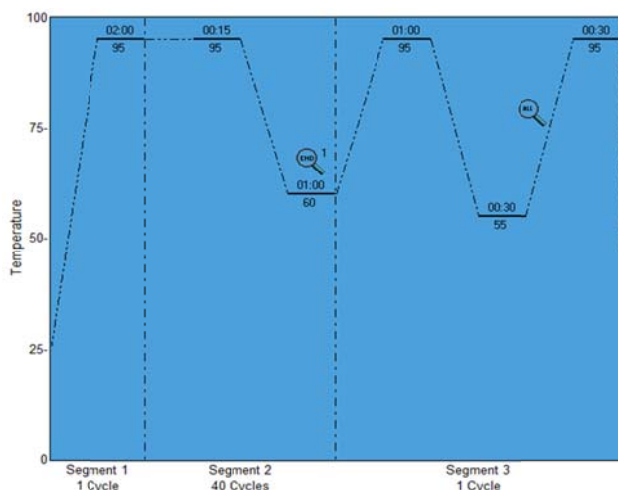
如果待测目的基因含量较低，欲使用本产品进行 2 Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应时，如果第一步反转录反应采用的是 Promega 的 GoScript™ Reverse Transcription System (A5000)，cDNA 产物作为 DNA 模板时的添加量可以达到 PCR 反应体系总体积的 20%。通过多加入模板的方式，提高低拷贝基因检测的重复性；

如果待测目的基因含量较高，如内参基因 β-actin、GAPDH、18S 等，建议减少 DNA 模板加入量至 0.4-1μl，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的 DNA 模板添加量。

* 通常引物终浓度为 0.2μM 可得到较好结果。可以在 0.1~1.0μM 范围内调整引物浓度。当出现非特异性反应或引物二聚体时，可尝试将引物浓度降至 0.05~0.1μM。

- 2) 进行 Real Time PCR 反应：

建议采用下列图表显示的两步法 PCR 反应程序。如果使用的是 T_m 值较低的引物，两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应（见附录 5.C 实验条件的优化）。



两步法 PCR 标准扩增程序：

Segment 1 预变性	1 cycle	95°C	2 min
Segment 2 热循环	40 Cycle	95°C	15 sec
		60°C	1 min
Segment 3 熔解曲线(Dissociation stage)			

◆特别提示:

本产品中使用的GoTaq®热启动酶采用抗体法介导的热启动，预变性95℃、2分钟可完全激活酶活性。同时GoTaq®热启动酶具有更强的热稳定性，即使预变性时间延长至95℃、10分钟也不会降低酶活性，并且能够耐受更多的循环数（45-50循环）。因此，使用GoTaq® qPCR Master Mix进行实验，可根据实验要求延长预变性时间和增加循环数。

3) 实验结果分析

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行绝对定量时制作标准曲线等（见附录 5.E Real Time PCR 数据分析）。

5 附录

5.A 快速操作指南

用于实验记录及实验过程中随时参考的快速操作指南，包括简化的操作步骤、所需材料列表、反应混合液的配制、PCR 程序设置、96 孔板上样设置，请根据实验设计进行调整和填写。

<p>为例): 冰上, 用 震荡混匀, 反应孔; H₂O 各 2 μl 管底气泡; 管反应。</p>	<p>封口膜</p> <p>样品</p> <p>Mix</p>
<p>循环数</p> <hr/> <p>10</p> <p>程序。</p> <hr/>	<p>品个数</p> <hr/> <p>___ μl</p> <p>___ μl</p> <p>___ μl</p> <p>___ μl</p> <p>___ μl</p> <p>___ μl</p>

96 孔板上样设置:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

5.B RT-qPCR 时的实验方法

进行 RT-qPCR 时，使用 Promega GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (A6010)，操作更方便，结果更可靠。GoTaq® 2-Step RT-qPCR System 由两部分组成：GoScript™ Reverse Transcription System (A5001) 和 GoTaq® qPCR Master Mix。GoTaq® 2-Step RT-qPCR 系统将 GoScript™ 逆转录酶的高效逆转录活性和 GoTaq® qPCR Master Mix 的超亮荧光结合在一起，可对各种长度的 RNA 靶标进行优质、灵敏地定量检测。此系统主要功能包括：

- 高效合成全长 cDNA；
- 低拷贝和高拷贝靶标均可被灵敏检测；
- 对多种样品均可呈现良好的线性；
- 在抑制剂存在时仍具有强劲活性；
- GoScript™ Reverse Transcription System 合成的 cDNA 产物对后续 qPCR 反应无抑制作用。作为模板可加至 qPCR 反应体系的 20%。通过增大模板的用量，可以提高低拷贝基因的检测准确度和重复性。

进行反转录反应时，按以下步骤进行：

- 1) 按下表配制模板 RNA 与引物的混合液：

组分	体积 (20µl 反应体系) *	终浓度
RNA (最高 5µg/反应)	_____µl	
Oligo(dT) ₁₅ Primer*	1µl	0.025µg/µl
Random Primer	1µl	0.025µg/µl
Nuclease-Free Water(加至 10µl)	_____µl	
终体积	10µl	

*反应体系可按比例放大

* Oligo(dT)₁₅ Primer 与 Random Primer 同时使用，可有效提高反转录效率，建议同时使用。

使用单引物进行反转录时，建议使用随机引物 Random Primer。

使用单引物进行反转录时，使用量：Oligo(dT)₁₅ Primer, 1µl (终浓度 0.025µg/µl) 或 Random Primer, 1µl (终浓度 0.025µg/µl)。

也可使用基因特异的引物 (gene-specific primer) 进行反转录，使用 gene-specific primer 时建议加至终浓度 1µM。

- 2) 将 RNA 模板与引物的混合液 70℃ 变性 5min，完成后置于冰上 5min；
- 3) 按下表配制反转录混合液：

组分	GoScript		终浓度
	反转录混合液	无酶阴性对照	
Nuclease-Free Water(加至 10 μ l)	1.5 μ l	2.5 μ l	
GoScript™ 5X Reaction Buffer	4 μ l	4 μ l	1X
MgCl ₂ , 25mM	2 μ l	2 μ l	2.5mM
PCR Nucleotide Mix, 10mM	1 μ l	1 μ l	0.5mM
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0.5 μ l	0.5 μ l	20units
GoScript™ Reverse Transcriptase	1 μ l	0 μ l	
终体积	10μl	10μl	

4) 向步骤 2)的模板与引物混合液中加入反转录混合液;

5) 按下列程序进行 cDNA 第一链的合成:

Step	温度	时间
Anneal	25°C	5 min
Extend	42°C	1 hour
Inactivate	70°C	15 min
Chill	4°C	Hold

6) cDNA 合成结束后可立即进行后续的 qPCR 基因定量, 也可储存于-20°C 备用;

以上的操作步骤采用标准的反应程序, 以确保全部 RNA 能高效、全长反转录成 cDNA。简化的反应程序, 例如取消 RNA 在 70°C 5min 变性及 25°C 5min 退火, 而将模板 RNA、引物、反转录酶等混合后**直接进行 42°C 15min 延伸**亦可保证绝大部分的 RNA 反转录成 cDNA, 能够进行成功的 qPCR 基因定量。关于反转录条件的简化及优化, 见 GoTaq® 2-Step RT-qPCR System 的操作手册 TM337:

<http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/101/gotaq-2-step-rt-qpcr-system-protocol/>。

5.C 实验条件的优化

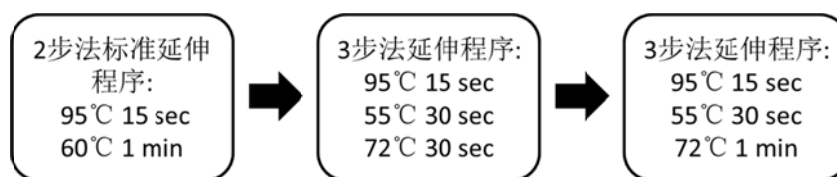
成功的 Real Time PCR 实验应表现为：

- 扩增曲线呈“S”形；
- 熔解曲线呈单峰，将产物跑胶观察条带无引物二聚体或其他非特异性扩增；
- 扩增产物起峰早（Ct 值小）；
- PCR 扩增效率高（接近理论值 100%）。

对 Real Time PCR 反应条件的优化主要从以下几个方面进行：

- 1) **预变性时间：**本产品使用的 GoTaq®热启动酶采用抗体法介导的热启动，预变性 95℃，2 分钟可完全激活酶活性。同时 GoTaq®热启动酶具有更强的热稳定性，即使预变性时间延长至 95℃、10 分钟也不会降低酶活性，并且能够耐受更多的循环数（45-50 循环）。因此，如果采用的 PCR 模板是基因组 DNA 或质粒 DNA，需要延长预变性时间时，可延长至 5-10 分钟。当待测基因在样品中的含量极低，Ct 值很大，扩增曲线不完整时，可增加循环数以得到完整的扩增曲线。
- 2) **引物浓度：**通常引物终浓度为 0.2μM 可得到较好结果。可以在 0.1~1.0μM 范围内调整引物浓度。一般情况下，降低引物浓度有助于提高扩增的特异性，提高引物浓度有助于提高扩增的效率。当出现非特异性反应或引物二聚体时，可尝试将引物浓度降至 0.05~0.1μM。
- 3) **引物的退火温度：**首次进行 Real Time PCR 的引物，其退火温度可以设置在比引物 Tm 值低 5℃。当有非特异性扩增时，可适当提高退火温度。必要时可进行梯度 PCR，以确定最佳退火温度。
- 4) **PCR 程序设置**（对反应的特异性和扩增效率非常重要）：

首次进行 Real Time PCR 时，可采用 2 步法标准延伸程序，当 Real Time PCR 反应扩增效率较低时，为提高扩增效率，可增加延伸时间或将两步法 PCR 改为三步法 PCR，如下图所示：



- 5) **镁离子浓度：**反应体系中镁离子浓度升高会提高 PCR 反应的效率，降低特异性。而降低镁离子浓度会提高特异性。GoTaq® qPCR Master Mix 中已含有中等浓度的镁离子（2mM）。需要调整时，可在 2mM-5mM 范围内进行。

5.D 引物设计及使用说明

设计用于 Real Time PCR 的引物，建议遵循以下原则：

- 1) 引物长度 15-25 个碱基；
- 2) 至少跨越一个内含子，以区分 mRNA 和基因组 DNA 的扩增片段；
- 3) GC 含量 50% (20%-80%)；
- 4) 引物的 T_m 值建议在 65℃ 左右，以用于标准的两步法 PCR 扩增程序。引物设计工具，推荐使用 NCBI 提供的 Primer BLAST* 工具；

* Primer BLAST:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome

- 5) 上游引物和下游引物的 T_m 值要接近。关于 T_m 值的计算，可以使用 Promega 提供的“T_m (Melting Temperature) Calculations for Oligos*” 工具；

* T_m (Melting Temperature) Calculations for Oligos:

<http://www.promega.com/resources/tools/biomath-calculators/>

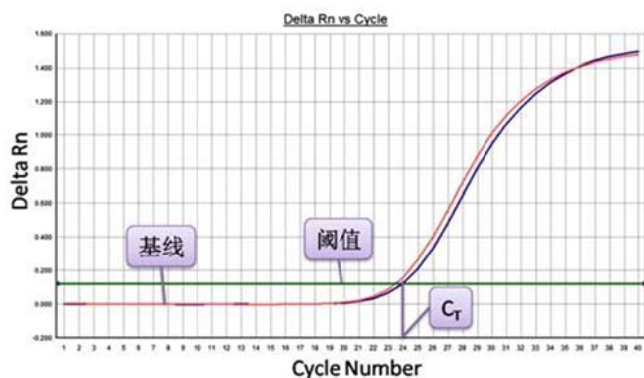
- 6) 扩增片段的长度不宜过长，一般为 50-250bp 之间。

对于大多数 GoTaq® qPCR 反应，上下游引物各 200nM 通常能够得到较好结果，当需要优化引物浓度时，可以在 0.05-1μM 之间进行。

5.E Real Time PCR 数据分析

Real Time PCR 实验完成后，通常可以得到以下三组数据：扩增曲线、标准曲线（只有采用标准品时才有）、溶解曲线（只有染料法才有）。对 Real Time PCR 结果进行分析，主要是研究此三组数据。

扩增曲线（Amplification curve）：根据扩增曲线输出 C_T 值



Rn: 一个反应管经 n 次热循环的荧光经参比荧光校正后的强度。

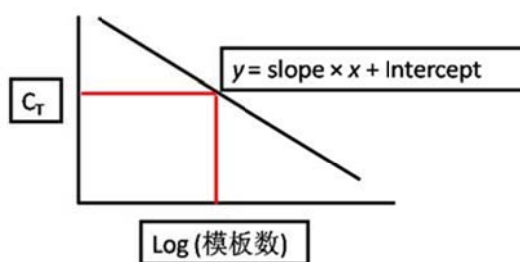
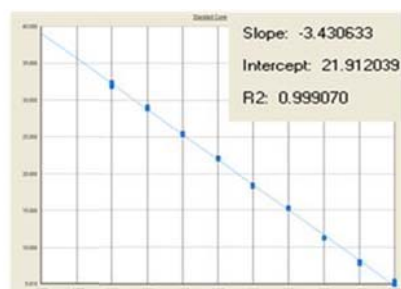
ΔRn : Rn 减去基线水平的荧光强度。

Baseline: 基线，在 PCR 的最初几个循环中，荧光信号几乎不变，是反应的背景荧光。通过设定基线可以从读数结果中扣除荧光背景。

Threshold: 荧光（Rn）超过本底达到可检测水平时的临界数值。

C_T : threshold cycle, 阈值对应的循环数。

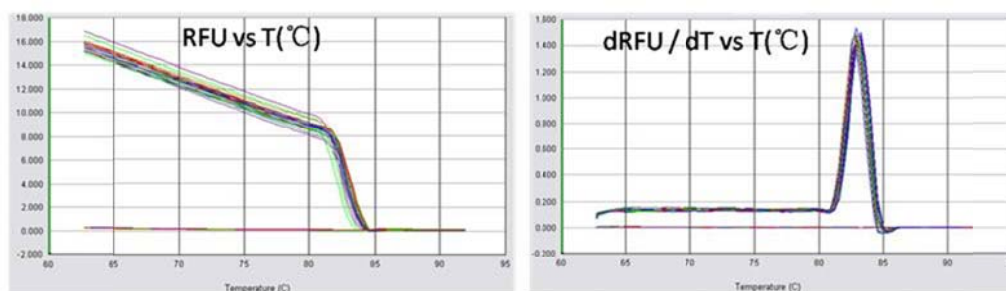
标准曲线（Standard curve）：根据标准曲线计算拷贝数与扩增效率



- **Slope(斜率)**: 与扩增效率相关
- **R^2** : 线性度，95%以上
- **Efficiency**: PCR 扩增效率
 - 100% efficient: slope = -3.3
 - Expect -3.3 ± 0.3

$$\text{Efficiency} = \left[10^{\left(\frac{-1}{\text{slope}} - 1 \right)} \right] \times 100\%$$

溶解曲线（Dissociation curve）：根据溶解曲线判断产物特异性



T_m : Melting Temperature（解链温度），PCR 双链产物的退火温度。单峰表示 PCR 产物单一。

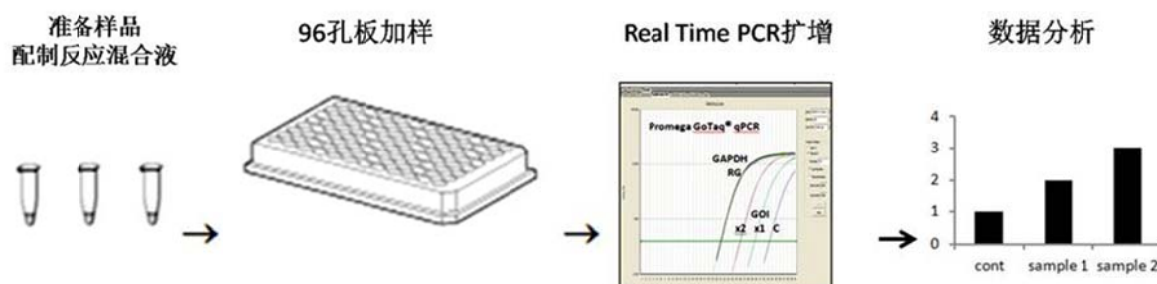
5.F 相对定量 vs 绝对定量

相对定量

相对定量：确定目的基因在待测组中的含量与对照组相比升高或减低的倍数。其中，对照组是未经过药物处理的对照，或处理时间序列中处理时间为 0hr 的样品点。待测组为需要观察药物作用的样品组或处理一定时间后的样品组。

相对定量法实验设计简单，无需标准品 DNA，无需建立标准曲线，以待测基因升高或降低的倍数来反映药物或处理方法对待测基因的影响。

相对定量方法： $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法。下图为实验流程图：



$2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法数据分析：

第一步，Real Time PCR 扩增结束后输出对照组和待测组的目的基因及内参基因的 C_T 值如下（表格中的数据仅作参考用）：

C_T 值	对照组 (control)	待测组 (#1)	待测组 (#2)
GAPDH	21.10	21.10	21.10
GOI (gene of interest)	33.33	29.56	25.93

第二步，用内参基因的 C_T 值归一化目的基因的 C_T 值。计算 ΔC_T ， $\Delta C_T = C_{T(GOI)} - C_{T(GAPDH)}$ ，结果如下：

	对照组 (control)	待测组 (#1)	待测组 (#2)
ΔC_T	12.23	8.46	4.83

第三步，用对照组的 ΔC_T 值归一化待测组的 ΔC_T 值。计算 $\Delta\Delta C_T$ ， $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(待测组)} - \Delta C_{T(对照组)}$ ，结果如下：

	对照组 (control)	待测组 (#1)	待测组 (#2)
$\Delta\Delta C_T$	0	-3.77	-7.40

第四步，计算相对于对照组的表达水平比率。求 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ，结果如下

	对照组 (control)	待测组 (#1)	待测组 (#2)
$\Delta\Delta C_T$	0	-3.77	-7.40
$2^{-\Delta\Delta C_T}$	1	13.64	168.9

最后，将 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 的结果代入 GraphPad Prism 或 SPSS 等统计软件绘制统计图。

绝对定量

绝对定量是确定目的基因在未知样品中的绝对拷贝数的 Real Time PCR 定量方法。

绝对定量方法要对未知样品中目的基因进行定量，首先需要有标准品 DNA，将标准品 DNA 与未知样品同时进行 Real Time PCR 反应，建立标准曲线，利用标准曲线计算出未知样品中目的基因的含量。该方法可以精确定量未知样品中目的基因的分子个数。

进行绝对定量的方法：

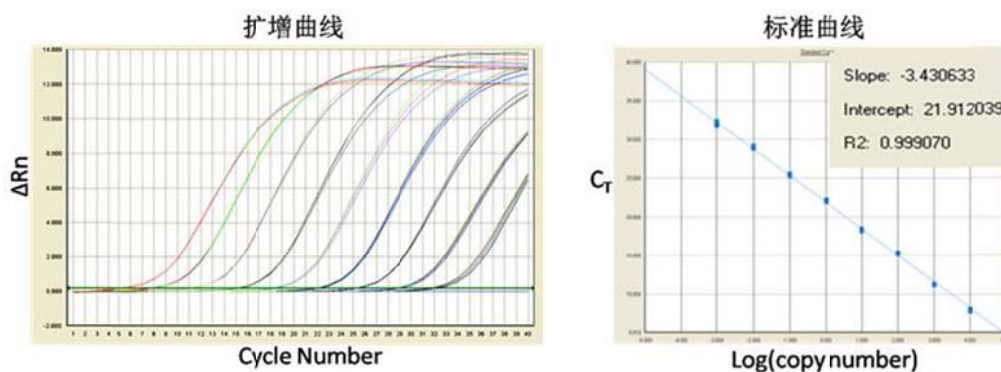
第一步，要有标准品 DNA。能够用作标准品 DNA 的有：1. 含有和待测目的基因相同扩增片段的纯质粒 DNA；2. 目的基因 PCR 产物经切胶纯化得到的 DNA。然后测量经过纯化的标准品 DNA 的 A260 吸光度值，得到标准品 DNA 的浓度。将标准品 DNA 的浓度代入下列公式，计算出标准品 DNA 中每微升的绝对拷贝数（注意单位的换算）：

$$\text{DNA (copy/ } \mu\text{L)} = \frac{6.02 \times 10^{23} \text{ (copy/mol)}^* \times \text{DNA concentration (} \mu\text{g/ } \mu\text{L)}}{\text{DNA length (bp)}^{\#} \times 660 \text{ (daltons/bp)}}$$

* 6.02×10^{23} ：阿伏伽德罗常数，每摩尔的分子个数。

DNA length：标准品 DNA 的长度。如果标准品是质粒 DNA，DNA length 就是质粒 DNA 的全长加上插入片段的长度。如果标准品是 PCR 产物，DNA length 就是 PCR 产物的长度。

第二步，将标准品模板进行倍比稀释后进行定量 PCR，得到标准品的扩增曲线，建立标准曲线。如下图：



第三步，在标准曲线上，根据未知样品的 C_T 值，读出绝对拷贝数。

通常，Real Time PCR 仪器软件自带的程序可以自动完成建立标准曲线的任务，并根据标准曲线自动计算出未知样品中目的基因的绝对拷贝数。

最后，将目的基因的绝对拷贝数代入 GraphPad Prism 或 SPSS 等统计软件绘制统计图。

5.G 常见问题

表现	原因	解决方法
阴性对照有扩增	反应体系被污染	模板交叉污染 使用带滤芯的枪头
		PCR 产物气溶胶污染 1. 反应体系中加入 UNG 酶/dUTP (成本增加) 2. 将 PCR 反应体系的准备与产物跑胶分开在不同的房间进行
		反应体系的其他组分被污染 换用新的组分
	有引物二聚体	1. 降低引物浓度至 0.1-0.05 μ M 2. 将 PCR 扩增程序由两步法改成三步法 3. 如经过以上措施无改进, 重新设计引物
熔解曲线有 2 个或 2 个以上的峰	反应特异性差, 有引物二聚体或其他非特异性扩增	1. 降低引物浓度至 0.1-0.05 μ M 2. 将 PCR 扩增程序由两步法改成三步法 3. 重新设计引物
ΔR_n 不超过 1, 在低水平徘徊	无扩增	组分加错、无模板的阴性结果、引物问题等
扩增效率低于 90%	引物问题	重新设计引物
	难扩增模板	PCR 扩增阶段采用三步法、调整镁离子浓度等
	PCR 反应被抑制, 常见抑制剂包括乙醇、酚、heme、bile salt 等 (见参考文献)	将模板进行稀释或重新提取 RNA 或将 cDNA 纯化
	模板稀释错误	重新稀释模板
扩增效率高于 110%	非特异性扩增	降低引物浓度、改变退火温度、重新设计引物
	引物二聚体	降低引物浓度、重新设计引物
	模板稀释错误	重新稀释模板
R ₂ 小于 0.98	标准曲线的个别点结果有误	检查 C _T 最大的点和最小的点是否超出检测范围, 只有在线性范围内定量才是准确的
	模板稀释错误	重新稀释模板

参考文献: An Introduction to PCR Inhibitors,

<http://www.promega.com/resources/articles/profiles-in-dna/2007/an-introduction-to-pcr-inhibitors/>

5.H 相关产品

RT-qPCR System

Product	Size	Cat.#
GoTaq® 1-Step RT-qPCR System	200 reactions	A6020
GoTaq® 2-Step RT-qPCR System	200 reactions	A6010

For Laboratory Use.

Reverse Transcription

Product	Size	Cat.#
Reverse Transcription System	100 reactions	A3500
GoScript™ Reverse Transcription System	50 reactions	A5000
	100 reactions	A5001
GoScript™ Reverse Transcriptase	50 reactions	A5003
	100 reactions	A5004
ImProm-II™ Reverse Transcription System	100 reactions	A3800
ImProm-II™ Reverse Transcriptase	10 reactions	A3801
	100 reactions	A3802
	500 reactions	A3803
AMV Reverse Transcriptase	300u	M5101
M-MLV Reverse Transcriptase	10,000u	M1701
	50,000u	M1705
M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus	10,000u	M5301
M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutation	2,500u	M3681
	10,000u	M3682
	50,000u	M3683

For Laboratory Use.

RNA Purification

Product	Size	Cat.#
PureYield™ RNA Midiprep System	10 preps	Z3740
	50 preps	Z3741
	10 preps	Z3101
	50 preps	Z3100
	250 preps	Z3105
Maxwell® 16 Total RNA Purification Kit	48 preps	AS1050
Maxwell® 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit	48 preps	AS1220
Maxwell® 16 Cell LEV Total RNA Purification Kit	48 preps	AS1225

For Laboratory Use.

DNA Purification

Product	Size	Cat.#
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	100 isolations × 300µl	A1120
	500 isolations × 300µl	A1125
	100 isolations × 10ml	A1620
Wizard® SV Genomic DNA Purification System	10 preps	A2365
	50 preps	A2360
	250 preps	A2361
MagneSil® Blood Genomic, Max Yield System	1 × 96 preps	MD1360
MagneSil® ONE, Fixed Yield Blood Genomic System	1 × 96 preps	MD1370
MagneSil® Genomic, Fixed Tissue System	100 samples	MD1490
MagneSil® Genomic, Large Volume System	8 preps	A4080
	48 preps	A4082
	96 preps	A4085
Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit	48 preps	AS1010
Maxwell® 16 Cell DNA Purification Kit	48 preps	AS1020
Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit	48 preps	AS1030
PureYield™ Plasmid Miniprep System	10 preps	A1220
	50 preps	A1221
	100 preps	A1223
	250 preps	A1222
PureYield™ Plasmid Midiprep System	25 preps	A2492
	100 preps	A2495
PureYield™ Plasmid Maxiprep System	10 preps	A2392
	25 preps	A2393

For Laboratory Use.

Accessory Products

Product	Size	Cat.#
Maxwell® 16 Instrument	1 each	AS2000
Maxwell® 16 SEV Hardware Kit	1 each	AS1200
Maxwell® 16 LEV Hardware Kit	1 each	AS1250

For Laboratory Use.



普洛麦格(北京)生物技术有限公司 Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd

电话: 800 810 8133, 010 58256268

网址: www.promega.com.cn, www.promega.com



Promega

www.promega.com