

Taq-HS SYBR[®] Green qPCR mix (None/Low/High ROX & Universal)

包装量:

货号	组成	规格
ADS008BI0	2×SYBR Green qPCR Mix	5 mL

产品储存:

-20 °C 避光保存12个月, 使用前充分溶解混匀。Mix 融解后可在 4°C避光条件下稳定存放一个月, 尽量避免反复冻融。

产品简介:

本制品是采用SYBR Green I嵌合荧光法进行Real Time PCR的专用试剂, 为**2×预混液**。已经将DNA聚合酶、dNTP、特殊稳定剂、优化的反应缓冲液、BSA和SYBR Green I等试剂预混成一种适合Real Time PCR反应检测用2×Premix Type试剂, 使用时只需加入模板、引物和水, 可减少操作步骤, 缩短加样时间, 降低污染几率, 具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。其核心组分是抗体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶, 配合精心优化的Buffer体系, 有效抑制非特异性扩增, 可对宽广浓度范围的模板进行准确定量, 获得稳定可靠的 qPCR 结果, 可在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线, 对目的基因进行准确定量检测, 重复性好, 可信度高。

使用方法

1. 注意事项:

- 1) 本制品不含参比染料ROX, 客户可根据qPCR仪器技术指导决定是否加ROX参比染料, 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。
- 2) 本制品含SYBR Green I 强光下易分解, 降低灵敏度, 使用时避免长时间强光照射本制品。
- 3) 建议在冰上配制PCR反应液, 再放入PCR仪器中扩增。可以提高扩增特异性, 减少背景。
- 4) 使用前上下颠倒轻轻混匀 Mix, 请勿涡旋振荡混匀, 避免产生过多气泡。
- 5) 推荐的引物终浓度为 0.2μM, 可在 0.1~1μM 范围内优化。

2. 实验优化 若使用默认反应条件反应性能不佳时, 则需要对反应条件进行优化, 可以从引物浓度以及扩增程序两个方面进行:

- ① 引物浓度调整: 当引物终浓度在0.1~1.0μM范围之间变化时, 引物浓度越低, 扩增特异性越高, 但扩增效率会有所下降。
- ② 扩增程序优化: 需提高扩增特异性, 可使用两步法程序或提高退火温度; 需提高扩增效率, 可使用三步法程序或延长延伸时间。

3. 引物设计原则:

- a) 扩增产物长度建议控制在 80~200 bp; 引物长度为 18~25 bp;
- b) 正向引物和反向引物的 T_m 值相差不超过 1°C为佳, T_m值控制在58~62°C为佳;
- c) 引物的 GC 含量控制在 40%~60% 之间; 引物 3' 端最后一个碱基最好为 G 或者 C;
- d) 引物 A、G、C、T 整体分布尽量要均匀, 避开 T/C 或者 A/G 的连续结构 (特别是 3' 端);

- e) 避开引物内部或者两条引物之间的互补序列;
- f) 使用NCBI BLAST功能检索确认引物的特异性。

4. 建议PCR反应体系 (以50μL反应体系为例, 反应液配制请在冰上进行)

Components	Volume	Final Concentration
2× SYBR Green qPCR Mix	25 μL	1×
DNA Template DNA模版	2 μL	50 ~ 1000ng/50uL(最低可达5pg/50uL)
Forward Primer (10 μM) 正向引物	1 μL	0.2 μM each
Reverse Primer (10 μM) 反向引物	1 μL	0.2 μM each
ddH ₂ O to final volume总体积调节到50uL	To 50μL	Not applicable

5. qPCR 反应程序 (可根据机型适当调整)

三步法				两步法			
步骤	温度	时间		步骤	温度	时间	
预变性	95 °C	30sec		预变性	95 °C	30sec	
变性	95 °C	10sec	← 40 Cycles	变性	95 °C	10sec	← 40 Cycles
退火 ^a	55 ~ 65°C	10sec		退火 ^a &延伸 ^a	60°C	30sec	
延伸 ^a	72 °C	30sec					
溶解曲线 ^b	使用仪器默认采集程序			溶解曲线 ^b	使用仪器默认采集程序		

- a. 根据引物的T_m 值进行退火 (退火 & 延伸) 温度的设定; 若扩增片段在200 bp 以内, 延伸 (退火 & 延伸) 时间可以设置为15 sec; 此外, 延伸时间的设置还需根据qPCR 仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整;
- b. 不同qPCR 仪的溶解曲线采集程序有差别, 一般可使用仪器默认的溶解曲线采集程序。

6. 适配机型:

产品	适用机型	25uM ROX 用量 (50uL PCR反应体系)	ROX 终浓度
2× SYBR Green qPCR Mix (none ROX)	Bio-Rad CFX 全系列; Roche LightCycler™ 系列; Eppendorf Mastercycler® ep realplex 系 列; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® 系 列; Takara Thermal Cycler Dice; Analytikjena qTOWER系列等	0uL	0nM
2× SYBR Green qPCR Mix (Low ROX)	ABI 7500/7500 Fast, ABI ViiA 7™; ABI QuantStudio™ 系 列; Stratagene Mx3000P®/3005P™/4000™	0.05uL (0.05uL~0.1uL)	25nM~50nM
2× SYBR Green qPCR Mix (High ROX)	ABI 7000/7300/7700/7900 HT/7900 HT Fast, StepOne™, StepOne Plus™ 等	0.5uL (0.5uL~1uL)	250nM~500nM

问题描述	可能原因	解决办法
扩增曲线不光滑	荧光信号太弱，经系统校正后产生	确保 Mix 中预混的染料未降解；更换荧光信号收集更好的 qPCR 专用耗材
扩增曲线断裂或下滑	模板浓度较高，基线的终点值大于Cq值	减小基线终点 (Cq 值 -4)，重新分析数据
个别孔扩增曲线突然骤降	反应管内留有气泡	确保 Mix 完全溶解，请勿涡旋振荡混匀加样完成后轻弹离心去除气泡 延长预变性时间至 10 min，以去除气泡
反应结束无扩增曲线出现	反应循环数偏少	设置循环数为 40，但更多的循环数会增加过多的背景信号
	荧光信号采集步骤未设置或者设置错误	两当步将法信扩号增采程集序设一置般在将信号采集设置在退火 & 延伸阶段， 三步法扩增程序应72°C延伸阶段
	引物可能降解	长期未用的引物，应先通过 PAGE 电泳检测完整性，以排除其降解的可能
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数重复实验，样品浓度未知的情况下先从最高浓度做起
Cq 值出现过晚	模板降解	重新制备模板，重复实验
	扩增效率低	提高引物浓度，尝试三步法扩增程序，或者重新设计引物
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数重复实验，样品浓度未知的情况下先从最高浓度做起
	扩增产物过长	扩增产物长度控制在 80~200 bp
	体系中存在 PCR 抑制剂	一般为模板带入，加大模板稀释倍数或重新制备纯度高的模板重复实验
空白对照出现信号	反应体系污染	首管先或更启换用空新白的对照的水，如果还发生同样情况，继续更换引物、吸头、PCR Mix 反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染
	出现引物二聚体等非特异性扩增	一般析在 35 循环以后空白对照出现扩增产物属正常情况，应配合熔解曲线进行重新设计引物，调整引物浓度或优化 PCR 反应程序
熔解曲线出现多峰	引物设计不佳	根据引物设计原则重新设计新引物
	引物浓度过高	适当降低引物浓度
	cDNA 模板存在基因组污染	提污取染后，的或设RN计A跨溶内液含使子用引D物NA 酶进行消化，例如：dsDNase，以去除基因组使用精准的移液器、配合高品质吸头准确移液
实验重复性差	加样误差大	高倍稀释模板，加入大体积模板减少加样误差放大 qPCR 反应体积
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数重复实验
	qPCR 仪不同位置的温度偏差	定期校准 qPCR 仪