

2×TSINGKE® Master qPCR Mix (SYBR Green I with UDG)

目录号

TSE203

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，可对目的片段进行特异性的定量检测。产品中包含T5 DNA聚合酶、精心优化的K⁺/NH₄⁺ Buffer、PCR增强剂、dNTPs、SYBR Green I以及用于校正仪器孔间误差的ROX Reference和用于防止残余污染的UDG。本产品为浓度2×的预混液，使用时只需添加模板、引物和ddH₂O，使Mix工作浓度为1×即可。

本产品以dUTP代替了dTTP，可确保扩增产生的DNA中均含有尿嘧啶。UDG称为尿嘧啶-N-糖苷酶，可从单链或双链DNA上去除尿嘧啶残基，从而阻止含有尿嘧啶的DNA作为下几轮PCR的模板。PCR循环开始前的UDG孵育步骤，可以破坏前次反应残留的含尿嘧啶的PCR产物。经过去除污染步骤后，UDG在正常的PCR循环过程中被高温灭活，保证只有真正的目的序列得以扩增。

产品组成

组分	规格
2×TSINGKE® Master qPCR Mix (SYBR Green I with UDG)	5 × 1.0 mL

产品应用

本产品适用于SYBR Green染料法检测及分析的荧光定量实验。

产品特点

- 灵敏度高、特异性强、稳定性好；
- 抗体修饰的热启动酶，有效避免引物二聚体和非特异性扩增；
- 产品中含有UDG和dUTP，可防止前次反应的残余PCR产物的污染，结果更加准确可信；
- 产品中包含ROX Reference，可校正仪器孔间误差。

使用方法

1. 推荐PCR反应体系

组分	20 μL体系	50 μL体系	终浓度
2×TSINGKE® Master qPCR Mix (SYBR Green I with UDG)	10 μL	25 μL	1×
10 μM 上游引物	0.8 μL	2 μL	0.4 μM
10 μM 下游引物	0.8 μL	2 μL	0.4 μM
模板DNA*	见标注	见标注	
ddH ₂ O	up to 20 μL	up to 50 μL	

a. 模板DNA用量因模板溶液中存在的靶基因的拷贝数不同而不同，可进行模板梯度稀释预试验得到合适的用量。模板用量建议不超过100 ng。若以未稀释的cDNA原液为模板时，用量不超过PCR反应总体系的10%。

2. 推荐PCR反应程序

建议采用两步法反应程序进行反应；若模板浓度低或qPCR扩增效率低时，可尝试三步法反应程序进行PCR反应。

A. 两步法反应程序

阶段	温度	时间	循环数
UDG孵育	50°C	2 min	1 cycle
预变性	95°C	2 min	1 cycle
循环反应	95°C	15 s	40 cycles 60°C采集荧光信号
	60°C	30 s	

溶解曲线分析

B. 三步法反应程序

阶段	温度	时间	循环数
UDG孵育	50°C	2 min	1 cycle
预变性	95°C	1 min	1 cycle
循环反应	95°C	15 s	40 cycles 72°C采集荧光信号
	55°C	30 s	
	72°C	30 s	

溶解曲线分析

注意事项

- 本产品适用于需ROX Reference校正的实时定量PCR仪。
- 建议提前混样配制反应体系，注意加样准确，避免操作误差。
- 采取必要的防污染措施，使用优质的实验耗材，操作时注意更换PE手套。
- 在优化qPCR反应时，应从操作、引物、反应条件等方面进行考虑。
- 设计高质量的引物，原则如下
推荐使用Primer3web (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) 或者IDT (<http://sg.idtdna.com/Scitools/Applications/RealTimePCR/>) 等在线软件设计引物；

上下游引物Tm应相近(约60°C)；

避开目的片段同源序列；

跨内含子设计，避免基因组DNA的影响；

目的片段长度控制在80~200 bp。

· 本产品请勿反复冻融。本产品保存或使用时应避免强光照射。

· 所使用仪器类型不同，熔解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。

■ 常见问题与解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
无Ct值 或Ct值偏大	模板浓度过低或降解	适当增加模板用量，检查模板是否降解，使用新鲜制备的模板
	模板纯度低，蛋白质、盐等杂质会影响PCR扩增和荧光检测	重新制备高质量的模板或对模板进行稀释，降低杂质浓度
	引物扩增效率低	重新设计高质量引物
	目的基因表达量低	提高模板中目的基因含量，如使用特异性引物进行反转
	反应循环数不够	循环数一般设置为40
NTC出现明显扩增	环境或气溶胶核酸污染	使用Trelief® Solution核酸清洁液(目录号:TSPO01)对环境进行清洁处理
	qPCR体系污染	使用RNase-free耗材
	存在引物二聚体	进行熔解曲线分析，结合高浓度琼脂糖凝胶电泳辅助判断是否为二聚体，若是则需重新设计引物
Ct值重复性	加样误差	使用优质耗材与移液器，避免加样挂壁，模板浓度不宜太高
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数
	仪器误差	选择适用仪器，定期校准

熔解曲线多峰	存在引物二聚体	进行熔解曲线分析，结合高浓度琼脂糖凝胶电泳判断是否为二聚体，若是则需重新设计引物
	非特异性扩增	重新设计引物
	环境或体系污染	使用Trelief® Solution核酸清洁液(目录号:TSPO01)对环境进行清洁处理；使用RNase-free耗材
	基因组污染	去除基因组DNA，或跨内含子设计引物
熔解曲线单峰但峰不尖锐	存在大小相近的非特异性扩增，起峰、落峰温度跨度较大	重新设计引物

■ 保存条件

-25~-15°C避光保存，保质期2年，干冰运输。

■ 技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议，欢迎随时与我们联系：

product@tsingke.com.cn。

