

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

■ 目录号

TSE201

■ 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。产品中包含经抗体修饰的T5 DNA Polymerase、精心优化的K⁺/NH₄⁺ Buffer、PCR增强剂、dNTPs、SYBR Green I，配套的ROX Reference Dye I/II可用于校正仪器孔间误差。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。

■ 产品组成

组分	规格
2×TSINGKE® Master qPCR Mix (SYBR Green I)	5 × 1.0 mL
50× ROX Reference Dye I (High)	200 µL
50× ROX Reference Dye II (Low)	200 µL

■ 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，兼容各种荧

光定量PCR仪。

■ 产品特点

- 灵敏度高、特异性强、稳定性好；
- 高效的热启动酶，有效避免引物二聚体和非特异性扩增；
- 配有适合不同机型的ROX Reference Dye。

■ 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)	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 ^a	见标注	见标注	
50× ROX Reference Dye I/II ^b	0.4 µL	1 µL	1×
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%。

b. 可根据所使用荧光定量PCR仪机型确定是否添加ROX Reference Dye或添加类型，如下表所示：

ROX选择	荧光定量PCR仪机型	
ROX Reference Dye I	Applied Biosystems	5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne™, StepOne Plus™
ROX Reference Dye II	Applied Biosystems	7500, 7500 Fast, ViiA™ 7, QuantStudio 3/5/6 Flex/7 Flex/12k Flex
	Stratagene	MX4000™, MX3005P™, MX3000P™
no ROX Reference Dye	ThermoFisher	PikoReal™
	Bio-Rad	CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon2, Chromo4™
	Roche	Applied Science LightCycler®480, LightCycler®2.0, LightCycler®96
	Qiagen/Corbett	Rotor-Gene®Q, Rotor-Gene®3000, Rotor-Gene®6000
	TaKaRa	Thermal Cycler Dice™ Real Time, System TP700/TP800/TP850/TP900/TP950
	Illumina	Eco qPCR
	Eppendorf	Mastercycler™ ep realplex, realplex 2s

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
预变性	95°C	1 min	1 cycle
循环反应	95°C	10 s	40 cycles
	60°C	30 s	60°C采集荧光信号

熔解曲线分析

B. 三步法反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95°C	1 min	1 cycle
循环反应	95°C	10 s	40 cycles 72°C采集荧光信号
	55~65°C	10 s	
	72°C	10~15 s	

熔解曲线分析

■ 注意事项

- 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：TSP001) 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：TSP001) 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。

