

ArtiCan^{ATM} SYBR qPCR Mix

■ 目录号

TSE501

■ 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,可对目的片段进行快速、高效、特异性的定量检测。预混液中包含抗体修饰的热启动DNA聚合酶、精心优化的buffer体系、优化的SYBR Green I浓度以及PCR反应增强剂,使产品具有特异性强、扩增效率高、扩增曲线标准等特点,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。此外配套的ROX Reference Dye I/II可用于校正仪器孔间误差。本产品为浓度2x的预混液,使用时只需添加模板、引物和ddH₂O,使Mix工作浓度为1x即可。

■ 产品组成

组分	规格
ArtiCan ^{ATM} SYBR qPCR Mix	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

- 超快的延伸速度;
- 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;
- 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
ArtiCan ^{ATM} SYBR qPCR Mix ^a	10 μL	25 μL	1×
10 μM上游引物	0.4 μL	2.0 μL	0.2 μM
10 μM下游引物	0.4 μL	2.0 μL	0.2 μM
模板DNA ^b	见标注	见标注	
50×ROX Reference Dye I/II ^c	0.4 μL	1.0 μL	1×
ddH ₂ O	up to 20 μL	up to 50 μL	

- 包含抗体修饰的热启动DNA酶、dNTPs、SYBR Green I、PCR反应增强剂等。
- 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%。

c. 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仪器机型	
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, ViiATM 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®, Opticon 2, 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

1) 标准程序:

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	20 s	

溶解曲线分析^d

2) 快速程序:

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95°C	20 s	1 cycle
循环反应	95°C	3 s	40 cycles
	60°C	10 s	

溶解曲线分析^d

d. 实验中使用仪器机型不同, 溶解曲线采集程序也有不同, 通常使用仪器默认溶解曲线采集程序即可。

■ 注意事项

- 产品尽量避免反复冻融。
- 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。
- 本产品应在彻底融化并上下颠倒充分混匀后使用, 为了获得最佳的扩增效率, 建议在冰上配制反应体系。
- 本产品中含有荧光染料, 配制qPCR反应液时应避免强光照射。
- 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T_m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。

■ 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	进行溶解曲线分析, 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值重复性差	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

溶解曲线多峰	存在引物二聚体	进行溶解曲线分析, 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
溶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。

