

ArtiCan^{CEO} SYBR qPCR Mix

■ 目录号

TSE401

■ 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, 可对基因组DNA、cDNA、质粒DNA、λDNA等目的片段进行重复性好、可信度高、特异性强的定量检测。预混液中包含化学修饰的经基因工程改造的Taq DNA Polymerase、精心优化的阳离子缓冲液、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
ArtiCan ^{CEO} SYBR qPCR Mix	5×1.0 mL
50×ROX Reference Dye I (High)	200 μL
50×ROX Reference Dye II (Low)	200 μL

01

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

■ 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;
- 化学修饰的热启动酶, 有效避免引物二聚体和非特异性扩增。

■ 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 ^{CEO} SYBR qPCR Mix ^a	10 μL	25 μL	1×
10 μM上游引物	0.4 μL	1 μL	0.2 μM
10 μM下游引物	0.4 μL	1 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 μL	1×
ddH ₂ O	up to 20 μL	up to 50 μL	

a. 包含DNA Polymerase, dNTPs, Mg²⁺, SYBR Green I 等;

b. 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, 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

02

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

03

本产品仅供研究使用, 不用于临床诊断。

2.推荐PCR反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95℃	5 min	1 cycle
循环反应	95℃	10 s	40 cycles
	60℃	30 s	

熔解曲线分析^d

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

■ 注意事项

- 本产品请勿反复冻融。
- 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℃);
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
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辅助判断是否为二聚体,若是则需重新设计引物

熔解曲线多峰	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℃避光保存,保质期2年,干冰运输。

■ 技术支持

本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。

