

SYBR® Green qPCR Mix (High ROX+)

货号: P2091b, P2092b, P2093b

产品简介

SYBR® Green qPCR Mix (High ROX+)是 2X 浓缩的实时定量 PCR 预混液, 使用时只需加入模板和引物即可进行反应。采用创新的热启动机制可以减少引物二聚体和其他次级产物对反应的干扰, 可以显著提高定量 PCR 的特异性、扩增效率, 得到更广的可定量扩增区域。采用了新的增强剂, 对各种目的片段 PCR 效率的波动可控制在最小范围内, 反复冻融对扩增性能影响极小。本品预混了进口参比染料 ROX, 适用于需要高浓度 ROX 校正的定量 PCR 机型, 如 ABI StepOnePlus 等。

产品组成

Component	P2091b	P2092b	P2093b
	(100 rxn/20µl reaction)	(500 rxn/20µl reaction)	(1,000 rxn/20µl reaction)
2X SYBR® Green qPCR Mix (High ROX+)ª	1 ml	1 ml × 5	1 ml × 10
超纯水	1 ml	1 ml × 5	-

a 包含 SYBR® Green I, Hotstart Taq DNA 聚合酶, Aptamer, dNTP, ROX Reference Dye 及反应缓冲液等。

保存条件

SYBR® Green qPCR Mix (High ROX+) -20℃避光保存 2 年, 4℃避光可短期保存。

质量控制

纯度检测: 经质量检测, 产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测: 经不同来源的模板和引物检测, 产品具有优秀的特异性、灵敏性及可重复性等。

应用举例

1. 配制反应体系 (以 ABI StepOnePlus 为例)

Component	Volume	Final Concentration
DNA template ^[1]	0.5-2 µl	1-4 µl Variable
Forward primer (10 µM) ^[2]	0.2 µl	0.4 µl 0.2 µM
Reverse primer (10 µM)	0.2 µl	0.4 µl 0.2 µM
2X SYBR® Green qPCR Mix (High ROX+) ^[3]	5 µl	10 µl 1X
ddH ₂ O	Variable	Variable -
Total volume ^[4]	10 µl	20 µl -

[1] DNA 模板建议用量 (10-20 µl 体系): 1-10 ng cDNA, 或 10-100 ng gDNA。加样体积不宜过小, 以免造成较大的误差, 但是 cDNA 的量不宜超过总体积的 1/10。

[2] 引物终浓度建议范围: 0.2-0.6 µM。特异性差时可降低浓度, 效率低时可提高浓度。

[3] 如果溶解曲线出现杂峰, 可以减少 Mix 用量至 8 µl (20 µl 体系); 如果对痕量模板的检出率较低, 可以增加 Mix 用量至 12 µl (20 µl 体系)。

[4] 建议总体积不小于 10 µl, 以免造成较大的加样误差。具体体积范围参考仪器说明。

注意: 本品预混了高浓度的 ROX Reference Dye, 适合需要高浓度 ROX 校准的仪器。不同类型仪器的 ROX 用量参照具体仪器说明, 下表仅供参考:

Instruments	Final Conc. of ROX
ABI PRISM 7000/ PRISM 7700/ 7300/ 7900HT/ StepOne/ StepOnePlus/ GeneAmp 5700	500 nM, high ROX
ABI 7500/ 7500 Fast/ ViiA 7/ QuantStudio 6/7/12K Flex; Agilent Stratagene Mx3000P/ Mx3005P/ Mx4000	50 nM, low ROX
Bio-Rad CFX96/ CFX384/ iQ/ iQ5; MJ Research Opticon 2/ Chromo 4; Roche LightCycler 480/ 96; Corbett Rotor Gene G/ Q/ 3000/ 6000; Thermo PikoReal 96; Eppendorf MasterCycler ep realplex; Cepheid Smart Cyclor	No ROX

2. 设定反应程序进行 qPCR 反应

请根据实验需要参考以下示例进行程序设置:

两步法程序示例如下：

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	94°C	3 min	1
Amplification	Denaturation	94°C	10 sec
	Annealing&Extension ^[2]	60°C	30 sec
Melting curve analysis (optional) ^[4]	95°C	15 sec	1
	60°C	60 sec	
	95°C	15 sec	

经典三步法程序示例如下：

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	94°C	3 min	1
Denaturation	94°C	15 sec	
Annealing	55-65°C ^[1]	15 sec	40
Extension ^[2]	72°C	20 sec^[3]	
Dissociation/Melting curve analysis (optional) ^[4]			

本品可用极速三步法快速完成反应，程序示例如下：

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	94°C	3 min	1
Denaturation	94°C	5 sec	
Annealing	55-65°C ^[1]	5 sec	40
Extension ^[2]	72°C	5-10 sec^[3]	
Dissociation/Melting curve analysis (optional) ^[4]			

[1] 最适退火温度需要摸索。退火温度一般设定为所用引物的 $T_m - 5^\circ\text{C}$ ，若低于 55°C ，则以 T_m 值为退火温度，一般不低于 55°C 。

[2] 在此步设置信号采集。

[3] 设置延伸时间时请考虑仪器类型，有些仪器需要设置 30 sec 以上。采用极速三步法时，150 bp 以内的扩增子可设置为 5 sec，150-300 bp 的扩增子可设置为 10 sec，300 bp 以上的扩增子可适当延长延长时间。

[4] 不同仪器熔解曲线采集程序不同，一般按仪器默认熔解曲线采集程序即可。

3. 分析结果

观察扩增曲线；调整基线，计算 Ct 值；观察熔解曲线检测特异性；进行相对或绝对定量。

注意事项

① 使用前 Mix 需要完全解冻，充分混匀。尽量避免多次反复冻融。短期使用可避光保存于 4°C 。

② 将 $(n+x)$ 份反应液混匀后再分注到 n 个单管中，可降低加样误差。（ n 为重复次数， x 为损耗量，一般为 n 的 $1/10$ ）

③ ABI 的定量仪器大部分需要 ROX 校正管间差异，Bio-Rad 的定量仪器不需要 ROX 校正。具体仪器请参照其使用说明。

④ 轻轻混匀反应液，避免产生气泡，气泡会干扰荧光检测。可瞬时离心去除气泡。

⑤ 引物的特异性、用量以及退火温度是影响实验结果的重要因素。务必设计特异性好的引物，随实验结果适当调整引物用量（ $0.05-0.9\ \mu\text{M}$ ）——特异性较差时减少引物用量，或以 3°C 为增量提高退火温度，扩增效率较低时增加引物用量。

⑥ DNA 模板的量应小于 $500\ \text{ng}/\text{反应}$ ，过高的模板量会引起非特异性扩增。应根据模板类型与基因表达量适当调整用量。

⑦ 熔解曲线的采集不是必须的，初次使用的引物建议进行熔解曲线采集。熔解曲线可以看出产物的特异性。产物特异性不好的原因有：引物特异性低；退火温度设置偏低；引物/模板浓度偏高；等。同时，建议通过琼脂糖凝胶电泳检测产物的特异性。

本品仅供科学研究使用。