

Biomarker 2X SYBR Green Fast qPCR Mix

目录: RK02001

规格: 5 mL

浓度: 2X

产品组成:

Biomarker 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (No ROX)	RM02001
50X ROX Reference Dye I	RM02101
50X ROX Reference Dye II	RM02104



产品说明

荧光定量PCR (Real-time Quantitative PCR) 是通过检测DNA双链结合的染料, 是SYBR® Green I对DNA扩增过程中的起始量进行定量监测的技术手段。Biomarker 2X SYBR Green Fast qPCR Mix是采用SYBR® Green I 嵌合荧光法进行qPCR反应的专用试剂。Biomarker 2X SYBR Green Fast qPCR Mix通过对SYBR® / FAM通道进行荧光信号定量检测, 可以获得PCR过程中DNA扩增的真实数据, 采用抗体法热启动Taq酶进行扩增, 在保证扩增效果的同时极大地提高了产品的特异性。同时通过对qPCR Mix的Buffer体系的优化, 使该产品适用于多个物种, 为多学科的实验需求提供了强有力的工具。

本产品为2X浓度预混液, 除引物和模板外包含了所有qPCR所需成分, 为实验操作提供了极大的便利。

产品组成

组分	5 mL
Biomarker 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (No ROX)	1 mL X 5
50X ROX Reference Dye I	220 µL
50X ROX Reference Dye II	220 µL

*包含 Biomarker HotStart Taq DNA polymerase, Mg²⁺, dNTPs, SYBR® Green I等

保存条件: -20°C避光保存。

适用机型

ROX类型	qPCR仪器
无需ROX 参比染料	Bio-Rad iCycler系列, Roche Light Cycler系列, Qiagen/Corbett 系列, Eppendorf等
ROX Reference Dye I (High Rox)	ABI 7000/7300/7700/7900, ABI StepOne/StepOne-Plus 等
ROX Reference Dye II (Low Rox)	ABI 7500, ABI ViiATM7, ABI QuantaStudio 系列, Stratagene系列, Corbett Rotor Gene 3000等

*注: 不同仪器所需ROX Reference Dye不同, 请参考上述机型。

实验准备

- 1、相应EP管, PCR管、移液器和枪头、冰盒或冰。
- 2、qPCR引物和相应模板。
- 3、荧光定量PCR专用tube或平板及密封光学薄膜。

操作方法

实验前准备:

- (1) 请确保引物的正确性和特异性。通常引物终浓度0.2 µM可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在0.1~1.0 µM范围内调整引物浓度。
- (2) 扩增产物的长度建议选择选择在70~200 bp范围内。
- (3) 梯度稀释模板, 并依次建立标准曲线。
- (4) 建议20 µL反应体系中加入1 pg~50 ng的DNA为模板, 并设计无模板对照(NTC)。
- (5) 为确保实验重复性, 建议每个样品和对照组设置3个复孔。

试验方法:

1、在冰上配制如下反应液:

试剂	使用量
Biomarker 2X SYBR Green Fast qPCR Mix	10 µL
Forward Primer (10 µM)	0.4 µL
Reverse Primer (10 µM)	0.4 µL
gDNA or cDNA (<50 ng)	2 µL
ROX I / II (如需添加, 根据机型选择)	0.4 µL
Nuclease-free H ₂ O	to 20 µL

- (1) 室温下融解Biomarker 2X SYBR Green Fast qPCR Mix, 然后置于4°C备用, 待完全融解后, 小心振荡混匀, 防止产生气泡, 最后离心收取底部液体。
- (2) 计算实验所需Mix体积, 并计算足够的余量(一般余量要多于10%)。
- (3) 在干净的PCR管或EP管内精确分取液体, 注意防止液体污染以及操作引起的误差。
- (4) 分别加入相应的引物和模板, 待所有试剂(Mix, 引物, 模板, ROX, 水)加入后, 混匀并瞬时离心。
- (5) 将上述反应体系转移到专用的qPCR板(管)内, 用光学密封薄膜仔细密封(注意转移时不要引起气泡, 并且液体尽量不要接触薄膜)。
- (6) 2500 rpm 离心qPCR板(管), 收集所有的反应液至孔底部, 准备上机。

步骤	温度	时间	循环数 (Cycles)
预变性	95°C	3 min	1
循环反应	95°C	5 s	40~45
	60°C	30~34 s	
熔解曲线	仪器默认设置		

*首先确保每步延伸完毕后进行信号采集。延伸时间请根据您使用的Real Time qPCR仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整: 使用StepOnePlus请设定为30 s; 使用7300请设定为31 s; 使用7500请设定为34 s。

数据分析:

1. 根据Ct值和样品投入量绘制标准曲线。标准曲线相关系数(R²)>0.98, 标准曲线斜率介于-3至-3.5之间, PCR扩增效率(E)一般介于90~120%。
2. 重复管之间Ct值的STD<0.2, 不同批次间同一实验的Ct值差值<0.5(不同批次间实验对比需保证阈值设置基本一致)。
3. 扩增产物的熔解曲线无明显非特异性扩增产物(杂峰)或引物二聚体杂峰(必要时请进行琼脂糖电泳确认), 并且熔解曲线的T_m值一般在80~95°C之间。
4. 有效Ct值的确认: 有效的扩增的Ct值应小于无模板对照曲线的(Ct-5)值, 并且其熔解曲线无杂峰。

注意事项

1. 使用Biomarker 2X SYBR Green Fast qPCR Mix时, 请充分融解后使用, 避免强光直射, 并注意避光保存。
2. 试剂中的Biomarker 2X SYBR Green Fast qPCR Mix含有甘油, 在使用前请轻轻混匀, 避免产生气泡; 分取前应先混匀, 离心收集液体后使用。使用后应立即放回-20°C冰箱保存。
3. 本产品含有聚合酶, 使用时请置于冰上操作, 短时间内如需多次使用可置于4°C暂时保存, 应尽量避免反复冻融。
4. 本产品配有特殊设计的ROX参比染料, 使用时根据qPCR仪器型号加入ROX参比染料。
5. 反应液的配制和分装须使用无污染的枪头、尽量避免污染, 推荐使用带滤芯的枪头。
6. 为保证反应的成功, 建议使用高质量的DNA模板。

常见问题与解决方案

1) 熔解曲线出现多峰

- a. 引物设计不够优化: 根据引物设计原则重新设计引物。
- a. 引物浓度太高: 适当降低引物浓度。

2) 扩增曲线形状异常

- a. 扩增曲线不光滑: 信号太弱, 提高模板浓度并重复试验。
- a. 个别扩增曲线骤降: 反应管内有气泡, 由于温度升高后气泡破裂, 使仪器检测到的荧光值突然降低所致。处理样本时要注意离心, 加样过程中尽量避免出现气泡。
- c. 扩增曲线上飘: 仪器默认基线设置为3~15循环的荧光值, 可根据实际扩增情况进行相应基线调整。另模板或引物降解可导致曲线上飘(必要时请进行电泳确认)。

3) 反应结束无扩增曲线出现

- a. 反应循环数不够: 一般设置循环数为40, 但需注意的是过多的循环会增加过多的背景信号, 降低数据可信度。
- b. 确认引物是否降解: 长时间未用的引物应先通过PAGE电泳检测完整性, 以排除引物降解的可能性。
- c. 确认程序中是否设置了信号采集步骤: 两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段; 三步法扩增程序应当将信号采集设置在72°C延伸阶段。
- d. 模板浓度太低: 减少稀释程度并重复试验。
- e. 模板降解: 重新制备模板, 重复试验。
- f. 预变性时间不足: 本产品采用热启动Taq酶, 请确保按照反应程序设置的3 min预变性时间进行操作。

4) Ct值出现太晚

- a. 扩增效率极低: 优化反应条件, 重新设计引物。
- b. 模板浓度太低: 减少稀释程度, 重复试验。
- c. 模板降解: 重新制备模板, 重复试验。
- d. PCR产物太长: 一般将PCR产物长度设计为70~200 bp范围内。
- e. 反应体系中存在PCR反应抑制剂: 一般为加入模板时带入, 加大模板稀释倍数或者重新制备新的模板。
- f. 预变性时间不足: 本产品采用热启动的Taq酶, 请确保按照反应程序设置的3 min预变性时间进行实际操作。

5) 阴性对照也出现明显扩增

- a. 反应体系或者水被污染: 更换新的Buffer或者水重复试验。
反应体系在超净工作台内配制, 减少气溶胶污染。
- b. 引物二聚体的出现: 一般在35个循环以后阴性对照出现扩增属正常情况, 可配合熔解曲线进行分析。

6) 试验重复性差

- a. 加样体积失准: 使用性能较好的移液枪, 扩大反应体系, 增加反应体积。
- b. 定量PCR仪不同位置温度控制不一致: 定期校准仪器。
- c. 模板浓度太低: 模板浓度越低, 重复性越差, 减少模板稀释度或提高加样体积。
- d. 阈值设置: 对于不同板间的重复试验, 请确保两次试验仪器阈值设置保持一致。