

版本号: M16B01V1.0



Genious 2X SYBR Green

Fast qPCR Mix

(High ROX Premixed)

TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

目录: RK21207

规格: 5 mL / 25 mL

浓度: 2X

产品组成:

Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (High ROX Preimxed)	RM21206
--	---------

产品说明

ABclonal Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (High ROX Premixed) 是采用 SYBR® Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 反应的专用试剂。本产品通过对 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。本产品采用抗体法热启动 *Taq* DNA 聚合酶进行扩增, 在保证扩增效果的同时极大地提高了产品的特异性。

本产品为 2X 浓度的预混液 (含有 High ROX), 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便利。

产品组成

名称	规格 5 mL	规格 25 mL
Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (High ROX Premixed) *	1 mL X 5	1 mL X 25

* 注: 包含 ABclonal Genious HotStart *Taq* DNA polymerase, Mg^{2+} , dNTPs, SYBR® Green I 等。

保存条件

-20°C避光保存

适用 qPCR 机型

ROX 类型	qPCR 仪器
High Rox	ABI 7000/7300/7700/7900, ABI StepOne/StepOnePlus 等

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。

注意事项

1. Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (High ROX Premixed) 在使用前请充分融解, 避免强光直射, 并注意避光保存。
2. 产品中含有甘油, 在使用前请轻轻混匀, 避免产生气泡; 取用前应混匀并离心。使用后应立即放回 -20°C 冰箱保存。
3. 本品含有聚合酶, 使用时请置于冰上, 短时间内多次使用可在 4°C 暂存, 应尽量避免反复冻融。
4. 本品为 ROX 预混型产品, 使用时无需添加额外的参比染料。
5. 反应液的配制和分装须使用无污染枪头, 为尽量避免污染, 推荐使用带滤芯的枪头。
6. 为提高反应的成功率, 建议使用高质量的 DNA 模板。

操作方法

实验前准备

- (1) 请确保引物的正确性和特异性。通常引物终浓度为 0.2 μ M 时可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在 0.1-1.0 μ M 范围内调整引物浓度。
- (2) 扩增产物的长度建议选择在 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 μ L 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) 为确保实验结果的准确性, 建议每个样品和对照组设置 3 个复孔。

实验方法

1. 在冰上配制 qPCR 反应液 (以 20 μ L 反应体系为例) :

组分	加入量
Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (High ROX Premixed)	10 μ L
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ L
gDNA or cDNA (<50 ng)	2 μ L
ddH ₂ O	to 20 μ L

- (1) 室温下融解 Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (High ROX Premixed), 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, 最后瞬时离心。
- (2) 计算实验所需 Mix 体积, 并预留足够的余量 (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, 待所有组分 (Mix、引物、模板、无酶水) 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), 准备上机。

2. 设置 qPCR 反应程序:

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		

*, 注: 确保延伸后进行信号采集。延伸时间根据使用的 qPCR 仪所需数据采集时间自行调整: 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 (R^2) > 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% 之间。
2. 复孔间 Ct 值的 STD < 0.2, 不同批次间同一实验的 Ct 值的 STD < 0.5 (不同批次同一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 值, 并且其熔解曲线无杂峰。

常见问题与解决方案

1) 熔解曲线出现多峰

- a. 引物设计不合理: 根据引物设计原则重新设计引物。
- b. 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实验。
- b. 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: 仪器默认基线为 3-15 个循环的荧光值, 可根据实际扩增情况调整基线。另外模板或引物降解也可导致曲线上飘 (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, 但需要注意的是过多的循环会增加背景信号, 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: 减少模板稀释倍数并重复实验。
- e. 模板降解: 重新制备模板, 重复实验。
- f. 预变性时间不足: 本产品采用热启动 Taq DNA 聚合酶, 请确保反应程序中预变性时间设置为 3 min。

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: 减少模板稀释倍数, 重复实验。
- c. 模板降解: 重新制备模板, 重复实验。
- d. PCR 产物太长: 设计的扩增子长度一般为 70-200 bp。
- e. 反应体系中含有 PCR 抑制剂: 一般为模板引入, 增加模板稀释倍数或者重新制备模板。
- f. 预变性时间不足: 本产品采用热启动的 Taq DNA 聚合酶, 请确保反应程序中预变性时间设置为 3 min。

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 或者水重复实验。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: 35 个循环后, 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) 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 仪孔间温度不一致：定期校准仪器。

- c. 模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，减少模板稀释倍数或提高加样体积。
- d. 阈值设置：对于不同板间的重复实验，请确保两次阈值一致。

相关产品推荐

产品名称	货号
ABScript II RT Master Mix for qPCR	RK20402
ABScript II RT Mix for qPCR with gDNA Remover	RK20403
ABScript II cDNA First-Strand Synthesis Kit	RK20400
2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix	RK21203
Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix	RK21204
Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (No ROX)	RK21205
Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (Low ROX Premixed)	RK21206
ABScript II One Step SYBR Green RT-qPCR Kit	RK20404