

产品组分

| 组分名称 | 组分编号 | 规格-1 | 规格-2 |
|--|---------|----------|-----------|
| | | 5 mL | 25 mL |
| Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (Low ROX Premixed) * | RM21205 | 5 × 1 mL | 25 × 1 mL |

*注: 包含 ABclonal Genious Hot-Start Taq DNA 聚合酶、Mg²⁺、dNTPs、SYBR® Green I 等。

产品说明

ABclonal Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (Low 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, 获得 PCR 过程中 DNA 扩增的真实数据。本产品采用抗体修饰热启动 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 Low ROX), 除引物和模板外包含了所有 qPCR 反应所需成分。

保存条件

-20°C避光保存

适用机型

| ROX 类型 | qPCR 仪器 |
|---------|---|
| Low ROX | ABI 7500、ABI ViiA™7、ABI QuantaStudio 系列、Stratagene 系列、Corbett Rotor Gene 3000 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. qPCR 专用平板及密封光学薄膜。

注意事项

1. Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (Low 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。

操作方法

实验前准备

1. 扩增产物的长度建议选择选择在 70-200 bp 范围内。
2. 建议 20 μL 反应体系中加入 1 pg-50 ng 的 DNA 为模板, 并设置 NTC (无模板对照)。
3. 为确保实验结果的准确性, 建议每个样品和对照组重复 3 次。

实验方法

1. 配制 qPCR 反应体系

| 组分 | 加入量 |
|-------------------------------------|----------|
| Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix | 10 μL |
| DNA 模板 * | 2 μL |
| 正向引物 (10 μM) ** | 0.4 μL |
| 反向引物 (10 μM) ** | 0.4 μL |
| dd H ₂ O | to 20 μL |

*注: 以 10-100 ng 基因组 DNA, 或 1-10 ng cDNA 为模板参照量, 因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同, 可对模板进行梯度稀释, 以确定最佳的模板使用量。另外, 两步法 RT-qPCR 反应的 cDNA (RT 反应液) 作为模板时, 添加量不要超过 qPCR 反应液总体积的 10%。

**注: 通常引物终浓度为 0.2 μM 时可以得到较好的结果, 可以终浓度 0.1-1.0 μM 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下, 可提高引物的浓度; 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度, 并优化反应体系。

2. 设置 qPCR 反应程序

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|------|-------|-----------|-------|
| 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 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(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%之间。
2. 重复管之间 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 Tm 值一般在 80-95°C 之间。
4. 有效 Ct 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。