

特点:

Tiosbio® 2×SYBR Green I qPCR Mix (with ROX) 是基于SYBR Green I嵌合荧光法进行Real-Time PCR的专用试剂, 该预混液包括化学修饰的热启动DNA聚合酶、反应Buffer、dNTPs、SYBR Green I、ROX染料等试剂, 试验时仅需加入引物、模板、水。预混液中添加的化学法修饰的Hot Start DNA聚合酶在50℃以下无活性, 95℃加热10~15min后方可完全恢复酶活, 从而有效地抑制非特异性PCR扩增, 极大提高了PCR扩增的特异性。预混液的反应缓冲液经反复优化, 可最大程度确保qPCR的扩增效率、检测灵敏性和信号强度; 添加的ROX荧光染料校正反应孔间的信号, 适用于Low ROX校正的Real-Time PCR仪, 如ABI PRISM7000/ 7700/7900HT, 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR, Stratagene的 Mx 3000P等仪器。

1. 单组分预混液, 使用方便;
2. 高特异性, 可有效抑制非特异性扩增;
3. 高灵敏性, 有效检测低表达丰度基因。

包装量及储存条件:

TR0201-1为1mL, 用量为100次(20μL/次); TR0201-5为5mL, 用量为500次(20μL/次)。

-20℃避光保存有效期为12个月; -70℃避光保存有效期为36个月; 长期-20℃保存融化后可能会出现沉淀, 只需室温融化后混合均匀即可。

使用方法:

1. 室温融解 2×SYBR Green I qPCR Mix (with ROX), 并按照下表配制 qPCR 的反应体系:

名称	体积 (μL)	终浓度
2×SYBR Green I qPCR Mix (with ROX)	10	1×
PCR Forward Primer(10 μM)	0.4~0.8	0.2~0.4 μM
PCR Reverse Primer(10 μM)	0.4~0.8	0.2~0.4 μM
模板	0.5~2 μL	
ddH ₂ O	至总体积 20	

2. 按照两步法设置 PCR 程序。扩增速度约为 1~2kb/min, 物种、目的基因及扩增引物对 PCR 反应条件略有影响。每个反应的具体运行程序根据试验情况进行调整。

循环	温度	时间
1st Cycle	95℃	15min*
35~40 Cycles	95℃	15~30sec
	60℃	30sec
Melting curve analysis		
Hold	4℃	Forever

*注: 该 Taq 酶为化学修饰的热启动 DNA 聚合酶, 须 95℃加热 15min 方可恢复酶活, 不可随意缩短该热启动步骤的时间。

3. 反应结束后确认 Real-Time PCR 的扩增曲线、融解曲线和标准曲线。

常见问题:

1. 无 CT 值 (信号) 出现

- ① 检查热启动时间是否为 15min; ② 引物降解, 使用新合成的扩增引物; ③ 模板量不足, 加大初始模板添加量。

2. CT 值出现过晚

① 扩增效率低, 优化反应条件, 重新设计扩增引物; 经过温度梯度确定适宜的退火温度, PCR 反应程序更改为下表中的三步法; PCR 产物最佳扩增区间为 100~400bp。

循环	温度	时间
1st Cycle	95°C	15min*
35~40 Cycles	95°C	15~30sec
	适宜退火温度	15~30sec
	72°C	20sec
Melting curve analysis		
Hold	4°C	Forever

3.标准曲线的线性关系不佳

①存在加样误差；②标准品降解，重新制备并稀释标准品；③不适宜的引物浓度，在 50~500 nM 之间优化引物的终浓度。

问题 4：融解曲线不止一个主峰

解决方法：

- (1) 将延伸温度从 60°C 提高至 65°C；
- (2) 引物浓度不佳，适当降低引物的浓度，并注意上下游引物的浓度配比；
- (3) 模板有基因组的污染，RNA 提取过程中应避免基因组 DNA 的引入，或通过引物设计避免非特异扩增；
- (4) 重新设计新的引物。

问题 5：出现引物二聚体

解决方法：

- (1) 尽管使用最为严谨的化学修饰法热启动 DNA 聚合酶，由于引物设计不佳或模板结构复杂，有时引物二聚体不可避免。此时可将循环数降低到 30~35。除此外，可使用去离子甲酰胺溶解引物（20μM）以减少引物自身的二级结构，并降低引物工作浓度；
- (2) 如引物二聚体 Ct 至低于样品 7 个以上，引物二聚体对结果的可靠性干扰将低于 1%，通常不影响实验结果。