

Power Green qPCR Mix

货号: P2101, P2102, P2103, P2104, P2105

产品简介

Power Green qPCR Mix 是 2×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。本品中的 DNA 聚合酶是新一代抗体技术修饰的 Hotstart Taq DNA 聚合酶, 在室温下活性被完全抑制, 从而可以在室温下配置反应液。采用这种热启动机制可以显著提高定量 PCR 的特异性、扩增效率, 得到更广的可定量扩增区域。本品采用了新的增强剂, 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。本品可与常见定量 PCR 仪完美兼容, 如 ABI、Roche、Bio-Rad 等。

产品组成

Component	P2101	P2102	P2103	P2104	P2105
nt	(100rxn/20 µl reaction)	(500rxn/20 µl reaction)	(1,000rxn/20 µl reaction)	(5,000rxn/20 µl reaction)	(10,000rxn/20 µl reaction)
2X Power Green qPCR Mix ^a	1 ml	1 ml × 5	1 ml × 10	1 ml × 50	1 ml × 100
超纯水	1 ml	1 ml × 5	-	-	-

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

保存条件

Power Green qPCR Mix -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 Bio-Rad CFX96 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 Power Green qPCR Mix ^[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: 本品不含 ROX Reference Dye。对于某些型号的仪器, 建议添加 ROX 校准信号误差。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 Cycler	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	40
	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	

经典三步法扩增效率较高，程序示例如下：

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

极速三步法可快速完成反应，程序示例如下：

Stage		Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation		94°C	3 min	1
Amplification	Denaturation	94°C	5 sec	40
	Annealing	55-65°C ^[1]	5 sec	
	Extension ^[2]	72°C	5-10 sec ^[3]	
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。尽量避免反复冻融。短期使用可避光保存于 4°C 。
- ② 本品灵敏度较高，在配制反应体系时注意避免气溶胶污染引起非特异性扩增。
- ③ 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 $1/10$ ）
- 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 ng/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。