

Power Green qPCR Mix (High ROX+)

货号规格

货号	P2101b	P2102b	P2103b
20- μ l 反应数	100 rxns	500 rxns	1,000 rxns

产品简介

Power Green qPCR Mix (High ROX+) 是 2 \times 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。本品预混了进口参比染料 ROX, 适用于需要高浓度 ROX 校正的定量 PCR 机型, 如 ABI StepOnePlus 等。

本产品可以免冰盒配制反应体系, 可以直接于常温进行 PCR Mix、引物、模板等组分的配制, 配制好的 PCR 反应体系可以常温放置 24 小时而保持扩增效率不变。

产品组成

Component	P2101b	P2102b	P2103b
2X Power Green qPCR Mix (High ROX+) ^a	1 ml	1 ml \times 5	1 ml \times 10
超纯水	1 ml	1 ml \times 5	-

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

保存条件

Power Green qPCR Mix (High ROX+) -20 $^{\circ}$ C 避光保存 2 年, 4 $^{\circ}$ C 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 ABI StepOnePlus 为例)

Component	10- μ l rxn	20- μ l rxn	Final Conc.
DNA template ^[1]	0.5-2 μ l	1-4 μ l	Variable
Forward primer (10 μ M) ^[2]	0.2 μ l	0.4 μ l	0.2 μ M
Reverse primer (10 μ M)	0.2 μ l	0.4 μ l	0.2 μ M
2X Power Green qPCR Mix (High ROX+) ^[3]	5 μ l	10 μ l	1X
ddH ₂ O	Variable	Variable	-
Total volume ^[4]	10 μ l	20 μ l	-

[1] DNA 模板建议用量 (10-20 μ l 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 μ M。特异性差时可降低浓度, 效率低时可提高浓度。

[3] 如果熔解曲线出现杂峰, 可以减少 Mix 用量至 8 μ l (20 μ l 体系); 如果对痕量模板的检出率较低, 可以增加 Mix 用量至 12 μ l (20 μ l 体系)。

[4] 建议总体积不小于 10 μ l, 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: 本品预混了高浓度的 ROX Reference Dye, 适合需要高浓度 ROX 校准的仪器。不同类型仪器的 ROX 用量参照具体仪器说明, 下表仅供参考:

Instruments	Final Conc.
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 Cyclor	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	95°C	1 min	1
Amplification	Denaturation	95°C	5 sec
	Annealing&Extension	60°C ^[1]	20~60 sec ^[2]
Melting curve analysis (optional) ^[3]			

三步法程序示例如下：

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	1 min	1
Denaturation	95°C	5 sec	
Annealing	55°C ^[1]	30 sec	40
Extension	72°C	30~60 sec ^[2]	
Dissociation/Melting curve analysis (optional) ^[3]			

[1] 如需提高特异性，可提高退火温度。请分别在“Annealing&Extension”或“Extension”阶段设置信号采集。

[2] 设置延伸时间时请考虑仪器类型。如需提高扩增效率，可增加延伸时间。

[3] 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℃。
- 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 μM) ——特异性较差时减少引物用量，或以 3℃ 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。