



TIANGEN官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动



Order: 010-59822688
Toll-free: 800-990-6057 /400-810-6057
TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD

版本号: FP171206

2. NTC出现较高的荧光值

| 原因 | 解决办法 |
|---------------|------------------------|
| 试剂污染 | 建议使用新试剂进行实验。 |
| PCR反应液配制时发生污染 | 采取必要的防污染策略(如使用带滤芯的枪头)。 |
| 引物出现降解 | 可以使用变性聚丙烯酰胺胶检测引物降解情况。 |

3. 出现引物二聚体和(或)非特异扩增

| 原因 | 解决办法 |
|------------------------|--|
| Mg ²⁺ 浓度不合适 | 使用FastFire qPCR PreMix的反应体系含有Mg ²⁺ 的终浓度为2 mM。对有些扩增体系，可以将Mg ²⁺ 终浓度增加到5 mM。建议每次增加0.5 mM Mg ²⁺ 浓度进行优化。 |
| PCR退火温度太低 | 建议每次增加2°C进行退火温度优化。 |
| 引物设计不合适 | 考虑重新设计引物序列。 |
| PCR产物太长 | 荧光定量PCR产物长度最好在100-150 bp之间，而且不应该超过500 bp。 |
| 引物出现降解 | 可以使用变性聚丙烯酰胺胶检测引物降解情况。 |
| 计量误差 | 反应体积太小会导致检测精度下降。请根据定量PCR仪推荐的反应体积重新实验。 |

4. 定量值重现性差

| 原因 | 解决办法 |
|---------------------|---|
| 仪器方面的故障 | 因为仪器的不适用，在温度管理或检测时产生重现性差。请根据相应仪器的说明书进行点检。 |
| 样品纯度不好 | 不纯的样品会导致实验的重现性差。 |
| 稀释的模板放置太久 | 通过梯度稀释的模板最好现配现用。 |
| 引物质量下降 | 尽量避免新合成引物批次间的差异，可以使用原来质量好的引物做为对照。 |
| PCR反应条件、引物浓度、序列等不恰当 | 扩增效率差的PCR较容易产生重现性差。通过变更引物的浓度或PCR反应条件来进行调整。扩增不好时，一般可降低退火温度或提高引物浓度，也可以延长延伸时间。如模板的GC含量较高，可延长变性时间。仍得不到改善时，建议重新设计引物。 |
| 计量误差 | 反应体积太小会导致检测精度下降。请根据定量PCR仪推荐的反应体积重新实验。 |

FastFire qPCR PreMix (SYBR Green)

FastFire快速荧光定量PCR预混试剂

(SYBR Green)

目录号: FP207

产品内容

| 产品组成 | FP207-01 20 μl × 125 rxn | FP207-02 20 μl × 500 rxn | FP207-03 20 μl × 5000 rxn |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 2 × FastFire qPCR PreMix (SYBR Green) | 1.25 ml | 4 × 1.25 ml | 10 × 4 × 1.25 ml |
| 50 × ROX Reference Dye | 250 μl | 1 ml | 10 × 1 ml |
| RNase-Free ddH ₂ O | 2 × 1 ml | 5 × 1 ml | 10 × 5 × 1 ml |

储存条件

收到本产品后，请立即置于-20°C避光保存。从-20°C取出使用时，将冻存的FastFire qPCR PreMix和ROX Reference Dye融解，然后轻轻颠倒混匀，待溶液完全均一后再行使用。如解冻后没有使用，须彻底混匀后重新冷冻。(在解冻过程中盐会出现分层现象，未混匀进行冷冻，盐晶体的析出将会对酶造成损害)。如需一段时间内经常取用，可在2~8°C条件下储存3个月。避免反复多次冻融。

产品简介

本产品是采用SYBR Green I嵌合荧光法进行Real-Time PCR的专用试剂，可对目标DNA进行快速、特异性的定量检测。优化的预混液可缩短Real-Time PCR的反应时间，适用于标准或快速PCR仪。

FastFire qPCR PreMix采用了抗体修饰的Anti Taq DNA聚合酶，配合独特的快速PCR Buffer体系可确保在所有的Real-Time PCR仪上进行灵敏的qPCR反应，具有反应快速、PCR反应时间缩短60%，同时具有高扩增效率，高扩增特异性和宽广的可信范围的特点，使你在不影响PCR效果的前提下更快获得结果，节约科研时间和能源。

试剂盒特点

1. FastFire qPCR PreMix采用了抗体修饰的Anti Taq DNA聚合酶，配合特制的快速PCR Buffer体系，可大大缩短变性、退火与延伸时间，可节省多达60%的反应时间，快速获得实验结果。
2. 本产品特制的快速PCR Buffer 体系含有独特的PCR稳定因子，在不损失PCR灵敏度和特异性的基础上进行快速反应，保证了FastFire qPCR PreMix高扩增效率，高扩增特异性和宽广的可信范围的特点。。
3. FastFire qPCR PreMix中预混有SYBR Green I，PCR反应液配制时，只需加入模板、引物、灭菌蒸馏水便可进行快速Real-Time PCR反应，操作简单方便。
4. 本产品附带ROX Reference Dye，用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，方便客户针对不同型号荧光定量PCR仪时选择对应浓度使用。

试剂盒原理

本产品采用了特异的抗体修饰热启动DNA聚合酶进行快速PCR扩增，通过检测反应进程中SYBR Green I 的荧光强度，达到检测PCR产物扩增量的目的，适用于标准和快速PCR仪。

1. 本产品中特异的抗体修饰热启动DNA聚合酶，95℃条件下孵育1 min即可激活全部酶活，在缩短变性时间的同时避免了非特异性产物的扩增。
2. 本产品的快速 PCR Buffer体系添加了独特的PCR稳定因子，配合精心优化的快速PCR Buffer体系，可大大缩短变性、退火和延伸时间，使PCR总运行时间缩短60%，更快获得实验结果，而不影响PCR反应效果。
3. 本产品针对cDNA模板和gDNA模板结构组成的差异，对PCR的反应步骤进行了特别的优化，使较难扩增的gDNA模板也能获得良好的PCR结果。

注意事项

1. 本产品中含有荧光染料SYBR Green I，保存本产品或配制PCR反应液时应避免强光照射。
2. 如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。使用时请上下颠倒轻轻混匀，请不要使用振荡器进行混匀，尽量避免出现泡沫，并经瞬时离心后使用。
3. 引物纯度对反应特异性影响很大，建议使用PAGE级别以上纯化的引物。
4. 引物终浓度为0.3 μM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。如果需要进一步优化，可以在 0.2-0.5 μM范围内调整引物浓度。
5. 20 μl反应体系中，cDNA模板的使用量一般小于100 ng，基因组DNA模板量一般小于50 ng，逆转录产物作为模板时，使用量应不超过PCR体系终体积的20%。

引物设计说明

进行Real-Time PCR反应时，PCR引物的设计非常重要。设计PCR扩增效率高，反应特异性强的引物可以参考以下要求。

◆ 设计引物要求如下：

| | |
|--------------|--|
| 引物长度 | 18-30个碱基 |
| GC含量 | 40-60% |
| Tm值 | 引物软件都可以给出Tm，与引物长度，碱基组成，引物使用缓冲的离子强度也有关。 上下游引物的Tm值要尽量接近。 简单的Tm计算公式为： $Tm = 4^{\circ}C(G + C) + 2^{\circ}C(A + T)$ 。 一般采用较引物Tm值低5℃作为PCR退火温度。 提高退火温度可以增加PCR反应的特异性。 |
| 引物及PCR扩增产物序列 | PCR扩增产物长度最好在80-200 bp之间。 尽量避开在模板的二级结构区域设计引物。 避免上下游引物3'端之间形成2个或以上的互补碱基以减少引物二聚体的形成。 引物3'端碱基不能有多于3个连续的G或C。 引物自身不应存在互补序列，否则引物自身会折叠成发夹状结构。 避免引物3'末端碱基为T。 引物序列中A、T、G、C要尽量均匀分布。 |

常见问题

1. 无扩增信号或扩增曲线起峰晚或仅有引物二聚体

| 原因 | 解决办法 |
|------------------------|---|
| DNA模板中存在抑制剂 | 重新纯化模板或降低模板使用量 |
| Mg ²⁺ 浓度不合适 | 使用FastFire qPCR PreMix时，PCR反应体系中Mg ²⁺ 的终浓度为2 mM。对有些扩增体系，可以将Mg ²⁺ 终浓度提高到5 mM。进行Mg ²⁺ 终浓度优化时，建议每次增加0.5 mM Mg ²⁺ 浓度进行实验。 |
| 加样错误或试剂问题 | 检查试剂浓度和保存条件，包括所使用的引物和模板。重复进行实验。 |
| PCR 条件、引物序列或浓度不当 | 请确认引物未发生降解，引物浓度及PCR 条件，扩增不好时，通常先尝试降低退火温度，延长退火时间和提高引物浓度，有时也可以提高退火温度，增加延伸时间，降低升温速度。对于GC 含量高的模板，可以适当延长变性时间。如果还是扩增不好，请重新设计引物。 |
| 起始模板问题 | 检查起始模板的浓度，保存条件和质量。重新对模板进行线性梯度稀释，并用新稀释模板进行实验。增加起始模板使用量。 |

进行RT-qPCR反应时的操作建议

进行RT-PCR反应时，有三种cDNA第一链合成试剂盒可以选择，分别是FastQuant RT Kit(with gDNase) (KR106)，Quant cDNA第一链合成试剂盒(KR103)，和TIANScript cDNA第一链合成试剂盒 (KR104)。

FastQuant RT Kit (with gDNase) (KR106) 可3 min去除基因组DNA的残留，使基因定量结果更加真实可信，适用于模板量为50 ng-2 μg的总RNA的快速反转录 (共需21 min)，是荧光定量PCR的反转录实验的最佳选择。

1. 将模板RNA在冰上解冻；5×gDNA Buffer、FQ-RT Primer Mix、10×Fast RT Buffer、RNase-Free ddH₂O在室温 (15-25℃) 解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

以下操作步骤请在冰上进行。为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先配制成Mix，然后再分装到每个反应管中。

2. 按照表1的基因组DNA的去除体系配制混合液，彻底混匀。简短离心，并置于42℃，孵育3 min。然后置于冰上放置。

表1 gDNA去除反应体系

| 组成成分 | 使用量 |
|-------------------------------|----------|
| 5×gDNA Buffer | 2 μl |
| Total RNA | - |
| RNase-Free ddH ₂ O | 补足到10 μl |

3. 按照表2的反转录反应体系配制混合液。

表2 反转录反应体系

| 试剂 | 使用量 |
|-------------------------------|----------|
| 10×Fast RT Buffer | 2 μl |
| RT Enzyme Mix | 1 μl |
| FQ-RT Primer Mix | 2 μl |
| RNase-Free ddH ₂ O | 补足到10 μl |

4. 将反转录反应中的mix，加到gDNA去除步骤的反应液中，充分混匀。

5. 42℃，孵育15min。

6. 95℃，孵育3min之后放于冰上，得到的cDNA可用于后续荧光定量PCR反应或低温保存。

操作方法

<1> 建立Real-Time PCR反应体系：

请注意将FastFire qPCR PreMix和ROX Reference Dye避光保存。

1. 融解FastFire qPCR PreMix (如果保存在-20℃)，ROX Reference Dye，模板，引物和RNase-Free ddH₂O，并将所有试剂在室温下溶解并彻底混匀。

2. 建议置于冰上进行Real-Time PCR反应液的配制。

反应体系：

| 组成成分 | 50 μl 体系 | 25 μl 体系 | 20 μl 体系 | 终浓度 |
|-------------------------------|----------|----------|----------|---------|
| 2× FastFire qPCR PreMix | 25 μl | 12.5 μl | 10 μl | 1× |
| 正向引物 (10 μM) | 1.5 μl | 0.75 μl | 0.6 μl | 300 nM* |
| 反向引物 (10 μM) | 1.5 μl | 0.75 μl | 0.6 μl | 300 nM* |
| cDNA模板 | - | - | - | -ng-pg |
| 50× ROX Reference Dye△ | - | - | - | - |
| RNase-Free ddH ₂ O | 至50 μl | 至25 μl | 至20 μl | - |

*引物终浓度为300 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时，可增加PCR反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少PCR反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的，可以在200-500 nM范围内调整。

△ 几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表：

| 仪器 | 终浓度 |
|---|--------------------------|
| ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/StepOne等 | 5× (例如：5 μl ROX/50 μl体系) |
| ABI 7500、7500 Fast； Stratagene Mx3000P、Mx3005P和Mx4000等 | 1× (例如：1 μl ROX/50 μl体系) |
| Roche仪器，Bio-Rad仪器，Eppendorf仪器等 | 无需添加 |

<2>进行Real-Time PCR反应

建议采用两步法PCR反应程序进行反应；若模板量较低等因素导致扩增效果不佳，可使用三步法程序进行PCR反应。

两步法反应程序:

| 阶段 | 循环 | 温度 | 时间 | 内容 | 荧光信号采集 |
|---|-----|---------|-----------|-------|--------|
| 预变性 | 1× | 95°C | 1 min | 预变性 | 否 |
| PCR反应 | 40× | 95°C | 5 sec | 变性 | 否 |
| | | 60°C Δ1 | 15 sec Δ2 | 退火/延伸 | 是 |
| 熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage) | | | | | |

三步法反应程序:

| 阶段 | 循环 | 温度 | 时间 | 内容 | 荧光信号采集 |
|---|-----|------------|-----------|-----|--------|
| 预变性 | 1× | 95°C | 1 min | 预变性 | 否 |
| PCR反应 | 40× | 95°C | 5 sec | 变性 | 否 |
| | | 50-60°C Δ3 | 10 sec | 退火 | 否 |
| | | 72°C | 15 sec Δ2 | 延伸 | 是 |
| 熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage) | | | | | |

Δ1 请先使用60°C 15 sec进行扩增。如果需要进一步优化, 可以尝试在56-66°C 范围内进行。

Δ2 使用不同型号仪器进行时间设定时, 请按照仪器使用说明书要求进行实验操作, 几种常见仪器的时间设定见下表:

使用ABI 7700/7900HT/7500 Fast, Roche, BioRad和Agilent等公司荧光定量PCR仪时请设定在15 sec。

使用ABI 7000和7300时请设定在31 sec。

使用ABI7500时请设定在32 sec。

Δ3 通常引物退火温度比引物的解链温度 (T_m) 低5°C, 如果引物碱基数较少, 可以适当提高退火温度, 这样可以使PCR的特异性增加; 如果碱基数较多, 那么可以适当减低退火温度。

3. 盖上反应管, 轻柔混匀。可短暂离心, 确保所有组分均在管底。

4. 将反应体系置于荧光定量PCR仪中, 开始反应。

<3> Real-Time PCR反应举例(PCR仪选用ABI 7500 Fast):

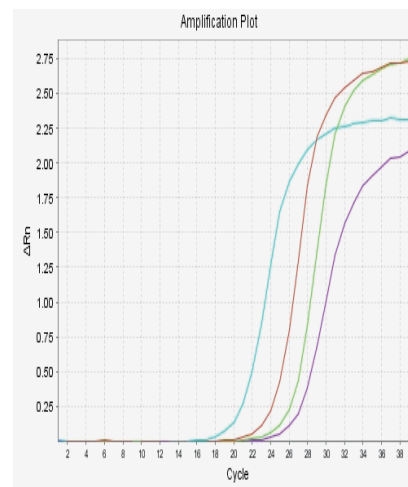


图1 扩增曲线

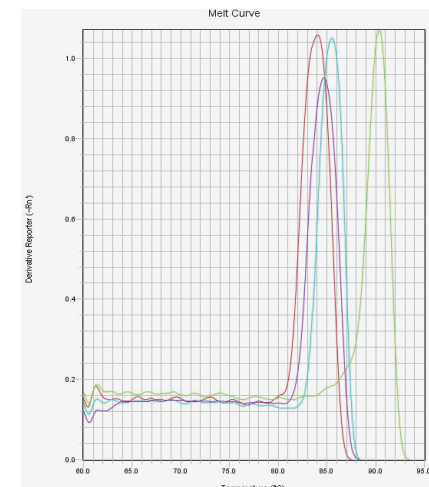


图2 熔解曲线

图1: 4对不同检测体系以单链cDNA为模板, 利用FastFire qPCR PreMix (Cat# FP207)

经qPCR测试后, 通过图2熔解曲线分析, 均为单一峰, 未发现非特异性扩增和引物二聚体产生。cDNA合成是使用FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒 (Cat#KR106) 进行。

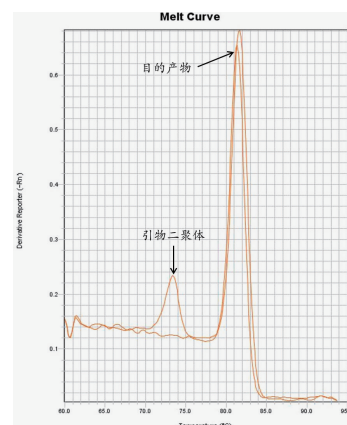


图3 熔解曲线分析

图3中使用FastFire qPCR PreMix的熔解曲线仅有单一峰, 为特异性扩增产物, 其T_m值为83.5°C; 使用国外A公司试剂除了特异性扩增产物外, 还出现了引物二聚体。引物二聚体的T_m值一般在75°C左右。