

TOROGreen® qPCR Master Mix

【产品货号】 QST-100

【包装规格】 20μL反应体系1000次

【产品描述】

TOROGreen® qPCR Master Mix是一种基于Taq酶的2×qPCR预混液，包含除引物外的所有成分。该预混液适用于SYBR Green I 的染料法定量PCR分析，可兼容各种定量PCR仪器系统。高封闭效率的Taq抗体热启动技术实现了高特异性和高重复性的扩增。专门优化的PCR缓冲液配方使预混液可高效扩增高GC含量模板，且使得试剂在室温下保持稳定。

根据MIQE指南，在NTC实验中，SYBR Green I qPCR预混液必须保证无引物二聚体扩增。与竞品相比，本产品大大降低了引物二聚体的产生。因此，本产品不仅可符合MIQE要求，还使得定量PCR引物设计更加容易。

【产品特征】

- 高特异性**：高封闭Taq抗体和优化的PCR缓冲液双重作用大大降低了引物二聚体的产生。
- 室温稳定**：在储存和运输过程中，性能不容易随温度变化而降低；完全室温配制体系。
- 宽线性范围**：可在8个模板梯度线性范围内展示很高的重复性。

【产品组成】

QST-100 可在20μL反应体系下使用1000次；QST-100P 可在20μL反应体系下使用500次。

货号	组分	包装
QST-100	TOROGreen® qPCR Master Mix	1 mL ×10管/ 盒
QST-100P	TOROGreen® qPCR Master Mix	1 mL ×5管/ 包

【存储条件】

本试剂在 2-8℃避光保存24个月。使用冰袋运输，冰袋融化后室温不影响产品性能。

【引物设计】

- **引物长度**: 18~30bp -**引物 GC含量**: 40~80% -**扩增子长度**: ≤ 200 bp
- **引物浓度**：引物在反应体系终浓度**推荐为0.4μM**，请在0.4-1.0μM之间进行优化调整。
- **引物验证**:
 - 无模板对照（NTC）实验可区分SYBR Green I qPCR 反应中引物二聚体的非特异扩增和特异PCR产物。**需用NTC实验验证每对引物，以评估引物二聚体影响程度。**NTC实验Cq<40时，应重新设计引物。
 - 将DNA模板稀释5个或更多梯度，使用新设计引物及DNA稀释液进行qPCR分析，并绘制标准曲线。**确保PCR效率在95%至105%之间，R²≥0.99**。如果PCR效率或R²超出这些范围，应优化引物浓度和反应条件。若不能改善结果，应当重新设计引物。

【模板DNA】

- 基因组DNA**：纯化的DNA可直接进行实时定量PCR，推荐使用浓度为1~10ng，Cq值处于15-35之间。
- cDNA**：纯化的总RNA或poly（A）+RNA的逆转录反应液需稀释后用于实时定量PCR，稀释是为了避免逆转录缓冲液对qPCR体系的抑制干扰，**稀释倍数建议至少5倍**。在进行逆转录反应之前，必须使用逆转录阴性对照来评估基因组DNA污染的影响程度。如果基因组DNA污染影响Cq值，则必须通过DNA酶处理来消除这种影响。

【操作流程】

1. 反应体系配制

-使用前2×qPCR预混液必须在室温避光下完全融化，且涡旋混匀后离心后使用。

注: 由于添加了大量稳定剂，预混液中可能有结晶沉淀产生，完全融化后可以正常使用；请在室温下进行体系配制，以防稳定剂微量结晶造成混合不均。

-为了降低加样误差，需做根据模板和基因数量进行布板设计及加样设计。按照如下两种情况，总反应体系分成两部分在室温下进行总管配制及分装。

同板内基因多样本少时的加样设计

组分	20μL 反应体积 ×n	操作方式
TOROGreen® qPCR Master Mix	10μL×n	混合及分装
模板DNA稀释液	2μL×n	
2μM 上游引物	4μL×n	混合及分装
2μM 上游引物	4μL×n	

同板内样本多基因少时的加样设计

组分	20μL 反应体积 ×n	Operation
TOROGreen® qPCR Master Mix	10μL×n	混合及分装
8μM Reverse primer	1μL×n	
8μM Reverse primer	1μL×n	
模板DNA稀释液	8μL×n	混合及分装

注: -引物在反应体系终浓度推荐为0.4μM，请在0.4-1.0μM之间进行优化调整。

-布板及总管加样设计是通过加大移液体积来提高复孔重复性，对低丰度基因表达分析非常重要。

-请将逆转录产物至少稀释5倍以上使用，以防逆转录缓冲液成分抑制qPCR反应。

- 轻轻混合后瞬时离心后上机。

2. PCR反应条件设置

- 绝大多数情况使用两步法：

两步法循环条件				
1	预变性	95°C	3min	1 循环
2	变性	95°C	10 sec	40 循环
	退火/ 延伸	60°C	30 sec	

荧光信号采集应该在延伸步骤进行，收集时间不低于10sec。

- 当Tm值太低或两步法扩增不正常时采用三步法：

三步法循环条件				
1	预变性	95°C	5min	1循环
2	变性	95°C	15 sec	40 循环
	退火	Tm-5°C	30 sec	
	延伸	72°C	60 sec	
3	终延伸	72°C	5min	1循环

荧光信号采集应该在延伸步骤进行，，收集时间不低于10sec。

注：当扩增片段≥200bp时，如DNA文库定量时请使用三步法扩增。

【适用机型】

- 该试剂可兼容无需ROX的实时定量PCR检测系统，例如:LightCycler (Roche); iCycler iQ, CFX96(Biorad/MJ); Thermal Cycler Dice(Takara), LineGene(bioer)等;

- 本试剂包含1× ROX, 也可兼容需要ROX校正的实时定量PCR检测系统, 例如: ABI PRISM 7000, 7700, 7900,7300;StepOne, Step one plus, ABI PRISM 7500, 7500Fast(ABI); Mx3000P, 3005P, MX4000,etc.(Agilent).

【常见问题】

1: 和竞品比为何Cq值偏大?

解答: 若Cq值偏大0.5-1属于正常范围, 这是由于本品进行最佳特异性优化, 不易被引物二聚体扩增伪影造成Cq值低的假象。该现象可进行NTC实验来验证是否有引物二聚体扩增伪影。

若Cq值偏大1以上, 说明有明显错误使用问题。可能原因及解决如下:

- (1) 竞品大量引物二聚体扩增, 请使用NTC验证, 保证扩增的真实性。
- (2) 未正确使用引物浓度, 本品建议引物在反应体系最终浓度在0.4μM以上。
- (3) 错误保存条件导致融化不充分, 本品建议2-8℃避光保存, 室温融化并涡旋混合后使用。
- (4) 仍使用冰上体系配制, 本品建议室温配制及加样, 并进行充分混合。
- (5) 逆转录缓冲液兼容问题, 本品建议逆转录反应液稀释5倍以上使用。

2: 为何复孔重复性差?

解答: 复孔重复性一般是由混合不均及加样设计不当造成; 请仔细参考操作流程中的布板设计及总管分管加样设计方法来提高复孔重复性, 以确保数据真实性。

3: 为何扩增效率低?

解答: 正确设计的绝大部分引物扩增效率处于90-110%之间, 若想提升到95%-105%之间, 请调整引物浓度或使用三步法循环条件。若仍然效果不理想, 请重新设计引物。

【应用数据】

1. 和竞品特异性比较:

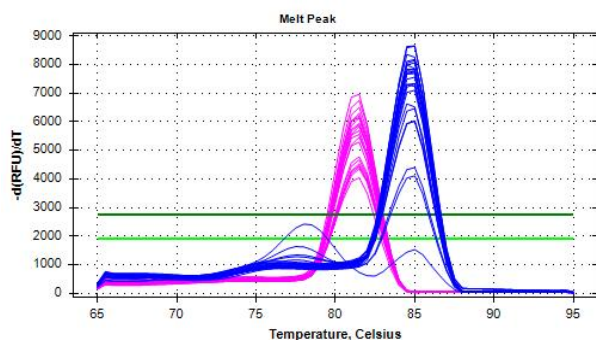


图1: 使用携带PDH基因的质粒进行qPCR实验, 引物为: (F: AGGAAGCCGATGTGTTCGTT; R: TTCCGCTTGCTGGTACACTT)。结果如右图所示, QST-100 (粉色) 在所有浓度下溶解曲线均为单峰, 而V品牌qPCR预混液在低浓度模板极容易出现引物二聚体峰。说明QST-100具有更高的特异性。

2. 热稳定性验证:

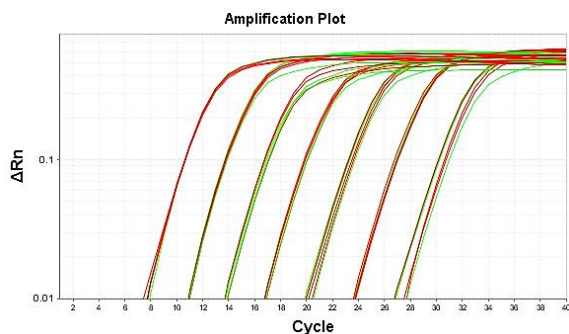


图2: 使用携带PDH基因的质粒进行qPCR实验, 分别将QST-100保存在37℃和-20℃。QST-100 在37℃ (红线) 保存和 -20℃保存 (绿线) 保存一周具有一致的扩增曲线和Cq值。说明QST-100具有很高热稳定性。

3. 线性范围及扩增效率验证

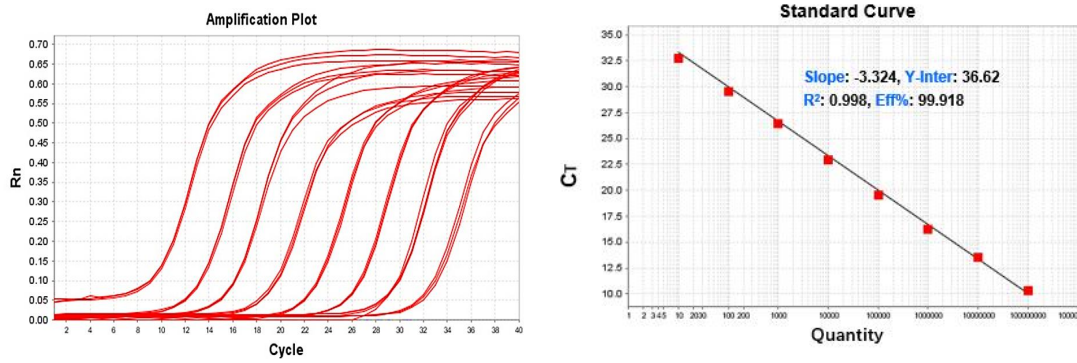


图3: 使用携带PDH基因的质粒进行qPCR实验,按10倍梯度浓度稀释制作标准曲线。结果如图所示, QST-100在8个浓度梯度范围内, 扩增效率为99.918%, R²为0.998。说明QST-100具有宽线性范围及高PCR扩增效率。

【参考文献】

[1] Bustin SA, Benes V, Garson JA, etc,al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.ClinChem.2009,Apr;55(4):611-22.

【应用文献】

- [1] Liu Q , Li X , Wu R ,et al.Development of an on-spot and rapid recombinase polymerase amplification assay for Aspergillus flavus detection in grains[J].Food Control, 2021, 125(4):107957.
- [2] Fei X , Ziqian W , Bingwu Y ,et al.Aldosterone alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by regulating epithelial sodium channel through PI3K/Akt/SGK1 signaling pathway[J].Molecular and Cellular Probes, 2021.
- [3] Li SJ, He CF, Feng Q.,et al.Establishment of two iPSC lines from healthy donor with heterozygous mutation in the SLC26A4 gene[J].Stem Cell Research,2022,64:1873-5061.
- [4] Xu K , Meng Z , Xian X M ,et al.LncRNA PVT1 induces chondrocyte apoptosis through upregulation of TNF- α in synoviocytes by sponging miR-211-3p[J].Molecular and Cellular Probes, 2020, 52:101560.
- [5] Su X , Zhu Y , Hou Y ,et al.PVT1 induces NSCLC cell migration and invasion by regulating IL-6 via sponging miR-760.[J].Molecular and cellular probes, 2020, 54:101652.
- [6] Xia CP , Pan T , Zhang N,et al.Sp1 promotes dental pulp stem cell osteoblastic differentiation through regulating noggin[J]. Molecular and cellular probes,2020, 50:101504.
- [7] MY Xie,LH Yang,JY Cheng,et al.Gracillin relieves pulmonary fibrosis by suppressing the STAT3 axis[J]. Journal of Ethnopharmacology,2023,316:116704,

【联系方式】



天筛（上海）科技有限公司.

总部: 中国上海宝山区江杨南路880号新杨湾科创园C1栋01幢 200439.

工厂: 中国江苏如东县珠江路888号生命健康产业园20号楼. 226400

Tel: +86-21-68030217

Mail: market@toroivd.com

http: //www.toroivd.cn