

2 × S6 miRNA SYBR qPCR Mix**货号:** Q206**保存条件:** -20 °C避光长期储存; 4°C避光存放6个月。**产品介绍:**

本品为SYBR Green I 嵌合荧光法进行miRNA定量反应的专用qPCR预混液。该预混液包含qPCR所需的酶、dNTP、缓冲液、荧光染料、参比染料等组分,使用时只需加入模板、引物、水即可,简便易用。其中本品所使用的聚合酶采用了PolyLock 热启动技术,较之抗体封闭、化学修饰等热启动方式具有封闭效率高,酶活释放快的优势。搭配针对qPCR精心优化的缓冲体系,该预混液具有灵敏度高,特异性强、定量范围广、重复性好的特点。另外本品预混了特殊的ROX参比染料,可兼容所有qPCR仪器,无需针对不同仪器额外添加相应的ROX。推荐与本公司HyperScript™ III miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (by stem-loop)(EnzyArtisan # R601)配合使用。

产品组成:

组分	Q206-01	Q206-02	Q206-03	Q206-04	Q206-05
2× S6 miRNA SYBR qPCR Mix	4 x 1.25 mL	8 x 1.25 mL	12 x 1.25 mL	16 x 1.25 mL	20 x 1.25 mL

温馨提示:

- 本品已预混适用所有qPCR仪器的ROX参比染料,无需额外添加ROX;
- 若解冻后管底出现白色或淡红色沉淀,请颠倒混匀确保沉淀完全溶解后使用;
- 本品含有荧光染料SYBR Green I,使用和存储时请避免强光照射;
- 配置反应液时,请使用灭菌枪头、Microtube等,同时避免产生气泡;

产品使用:**A.推荐反应体系**

2× S6 miRNA SYBR qPCR Mix 在冰上解冻后,混匀,按如下顺序加样:

2× S6 miRNA SYBR qPCR Mix	10 μL	5 μL
Primer-F (10 μM)	0.4 μL	0.2 μL
Primer-R (10 μM)	0.4 μL	0.2 μL
Template	x μL	x μL
ddH ₂ O	补足至 20 μL	补足至 10 μL

注:引物和模板使用量请根据需要调整,引物的终浓度范围在0.1-1 μM,通常引物的使用量增加可以提高灵敏度(Ct减小)但同时会降低特异性(出现引物二聚体等非特异性产物);未稀释的cDNA的加入量不应超过总反应体积的1/10。

B.推荐反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30秒	1
变性	95°C	3-10秒	40-45
退火&延伸	60°C	10-30秒	
融解曲线	使用仪器默认程序即可		

注:预变性温度和时间可以根据模板复杂度进行调整,如模板复杂度较高可以提高预变性温度并延长时间;对于长度小于200bp的扩增子,可以使用快速程序,即变性时间3秒,退火和延伸时间10秒。对于高GC的扩增子,可提高退火延伸温度至65°C;循环数设置为40-45可满足绝大多数的反应;对于Tm较低的引物,可使用三步法,比如退火温度设置在55°C,延伸温度设置为72°C,信号采集设置在延伸步骤。

1

常见问题及解决方案：

问题	可能原因	解决方案
无扩增曲线	缺少qPCR反应必需组分	确认是否加入适当的模板和引物
	反应程序设置不正确	确认选择FAM/SYBR的检测通道；确认信号采集设置正确，两步法设置在退火延伸步骤，三步法设置在延伸步骤
	试剂存在污染或过期	更换新的试剂
	模板或引物存在降解	更换新的模板或引物
	模板投入量过低	适当提高模板投入量
	加样时带入了PCR抑制物质	通常抑制剂是模板纯化时残留的物质，该情况可通过稀释模板缓解；必要时可进一步纯化模板
复孔重复性差	模板浓度较低，加样不精确	请避免加入小体积的低浓度模板，该情况下可以进行进一步稀释模板后加入大体积
	管材封闭性存在问题	上机前请确认PCR管已被封闭好，必要时更换管材
	组分没有充分混匀	请确保mix被充分混匀
	PCR管中存在气泡	请避免出现气泡
融解曲线不是单峰	出现T _m 值低于目的产物T _m 值的融解峰，低T _m 值的峰一般为引物二聚体	通过NTC（不加模板的control）确认，NTC如出现同样T _m 值较低的融解峰则可确认为由引物二聚体引起。可通过提高退火温度，重新设计引物解决（避免上下游引物3'端互补配对）
	出现T _m 值高于目的产物的T _m 值的融解峰，一般认为是过度扩增造成	可通过降低模板投入量，减少退火延伸时间解决
	使用cDNA存在基因组污染或mRNA存在可变剪切	使用DNase I 处理模板或跨内含子设计引物；更换可以区分可变剪切的引物。
	极少数目的产物过长会分段解链形成双峰	除非必要，请尽量将扩增子的长度控制在70-200bp的范围
标准曲线线性关系不佳	出现明显异常的点（加样或仪器不稳定造成）	剔除异常点进行计算
	标准品降解	更换新的标准品
	反应液中引入了抑制物	找到抑制物来源，更换相应组分
	NTC存在污染	更换试剂及实验环境（可在紫外灭菌后的超净台操作）
	低模板量加样存在误差	进一步稀释低浓度模板后加入大体积
与其他qPCR试剂相比，T _m 值不同	不同厂家的buffer使用了不同的盐离子浓度	内参基因和目的基因使用同一品牌试剂即可进行相对定量，T _m 绝对值没有比较参考价值的。
是否需要冰上操作		本品含有的热启动Taq DNA Polymerase可避免室温下引物的非特异性延伸，可以常温配置体系
是否兼容快速程序		扩增子在70-200bp时可使用快速程序，根据不同仪器可以节省40%-60%的时间，扩增子>200bp时，请使用标准程序。