

2 x Sybr Green qPCR Mix (With 100×ROX)

目录号: PR102

产品内容:

组成	PR102-01 (50次)	PR102-02 (200次)
2 x SYBR qPCR Mix	1.25 ml	1.25 ml x 4
ROX Reference Dye (100×)	25 μl	100 μl

产品储存: -20 °C 避光保存至少 6 个月, 使用前充分融解混匀。短期使用可放在 4 °C, 避免反复冻融。

制品说明: 本制品是采用 SYBR® Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。已经将热启动 HotMaster Taq DNA 聚合酶、dNTP、特殊稳定剂、优化的反应缓冲液、BSA 和 SYBR® Green I 等试剂预混成一种适合 Real Time PCR 反应检测用 2×Premix Type 试剂, 具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。使用时只需加入模板和引物和水, 便可在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线, 对目的基因进行准确定量检测, 重复性好, 可信度高。本品采用全新的 Hotmaster Taq DNA 聚合酶, 该酶不同于一般 Hot-start 酶之处在于, 一般的 Hot-start 酶只在第一步温度升高之前封闭酶的活性, 而 Hotmaster Taq DNA 聚合酶是利用抑制剂通过温度调节方式封闭 Hotmaster Taq DNA 聚合酶的底物结合位点, 温度低于 40°C 时, 形成非活性的酶-抑制剂复合物, 当温度升高至引物特异性的退火温度时, 结合平衡向模板-特异性引物复合物形成方向移动, 因此最大限度的减少 PCR 扩增全程中的非特异性扩增产物产生, 大大提高了荧光定量 PCR 反应的精确性。

注意事项:

1. 本制品含独立参比染料 ROX, 客户并根据 qPCR 仪器技术指导决定是否需加 ROX 参比染料, 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, 配套 ROX 产品货号为 PR111-Rox Reference Dye。
2. 本制品含 SYBR® Green I 强光下易分解, 降低敏感度, 使用时避免长时间强光照射本制品。
3. 建议在冰上配制 PCR 反应液, 再放入 PCR 仪器中扩增。可以提高扩增特异性, 减少背景。

4. 本制品含有4 mM MgCl₂ (反应体系终浓度是2 mM Mg²⁺), 可用25mM MgCl₂ 优化Mg²⁺浓度。

建议PCR条件(以25, 50 μl反应体系为例, 反应液配制请在冰上进行)

Components	Volume (25 μl)	Volume (50 μl)	Final Concentration
2 x SYBR qPCR Mix	12.5μl	25 μl	1×
DNA Template	1 μl	2 μl	as required
Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	1 μl	0.2 μM each
Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	1 μl	0.2 μM each
ddH ₂ O to final volume	25 μl	50 μl	Not applicable

PCR 循环 (二步法)

94°C 2-3 min

94°C 5-10 sec

60°C 30-34 sec

40 cycles

Dissociation Stage

PCR 循环 (三步法)

94°C 2-3 min

94°C 10-20 sec

55-60°C 10-20 sec 40 cycles

72°C 20-30 sec

Dissociation Stage

说明: 本制品兼容性强, 适用于不同厂家、型号的荧光定量PCR仪, 绝大多数情况下使用二步法和三步法均可获得良好效果。在实际使用中可以根据机型推荐和具体情况对程序加以微调。一般来说, 二步法扩增特异性高, 三步法扩增效率高。如果融链曲线较差, 可以尝试两步法扩增; 若因使用T_m值较低的引物等原因, 得不到良好的实验结果时, 可尝试加长延伸时间或者进行三步法PCR扩增。

荧光定量PCR实验常见问题和解决方案

A1: 无信号值出现

Q1:

1. 反应循环数不够。一般都要在 35 个循环以上，可根据实验情况增加循环（如至 45cycles），但高于 45 个循环会增加过多的背景信号。
2. 检测荧光信号的步骤有误。一般 SG 法采用 72℃ 延伸时采集，Taqman 法则一般在退火结束时或延伸结束采集信号。
3. 引物或探针降解。可通过 PAGE 电泳检测其完整性。
4. 引物或探针的设计，如探针高于引物的温度不够，造成探针未杂交上而产物已延伸的情况。
5. 模板量不足。对未知浓度的样品应从系列稀释样本的最高浓度做起。
6. 模板降解。避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。

A2: CT 值出现过晚

Q2:

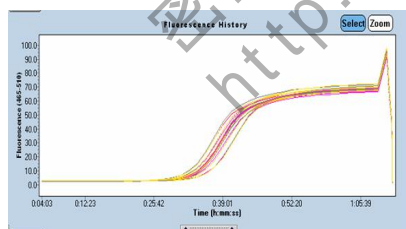
1. 扩增效率低，反应条件不够优化。设计更好的引物或探针；用三步法进行反应；适当降低退火温度；增加镁离子浓度等。
2. PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足。
3. PCR 产物太长。一般采用 100-150bp 的产物长度，一般不超过 500bp。

A3: 标准曲线的线性关系不佳

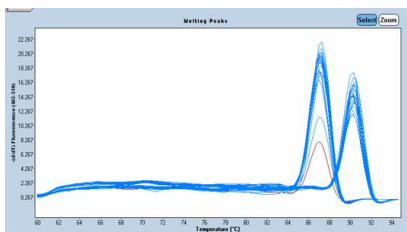
Q3:

1. 加样存在误差，使得标准品不呈梯度。
2. 标准品出现降解。应避免标准品反复冻融，或重新制备并稀释标准品。
3. 引物或探针不佳。重新设计更好的引物和探针。
4. 模板中存在抑制物，或模板浓度过高。

典型扩增曲线和融链曲线图（使用本制品在 Roche Light Cycler 480 II 三步法操作实际图片）



扩增曲线



融链曲线