SYBR Green qPCR Mix

荧光定量 PCR 试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL698A	荧光定量 PCR 试剂盒	5 x 1ml

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，将热启动 Taq DNA 聚合酶、dNTP、SYBR Green I 等试剂预混成即用的 2x Mix，可对目标 cDNA 进行快速并具有高特异性的定量检测。本产品采用化学修饰的 Hot Start Taq DNA 聚合酶，在 50 ℃以下无活性，只有 95 ℃条件下加热后才能完全恢复酶的活力，最大限度减少非特异性扩增产物的产生，提高荧光定量 PCR 反应的精确性。该试剂盒独特的反应缓冲液，可在宽范围中得到良好的扩增结果、检测灵敏度更高、信号更强。

产品组分：

产品编号	产品名称	规格
1	2×SYBR Green qPCR Mix	5 x 1ml
2	50×ROX Reference Dye	1ml

保存条件：

收到本产品后，请立即置于-20℃避光保存，一年有效。从-20℃取出使用时，将冻存的 SYBR Green qPCR Mix 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。如需一段时间内经常取用，可在 2～8℃条件下储存 6 个月。避免反复多次冻融。

使用说明：

一、配制 Real-Time PCR 反应体系：

1、将所有试剂 2×SYBR Green qPCR Mix，ROX Reference Dye，模板，引物和 RNase-Free ddH_2O，在室温下融解并彻底混匀，避免产生气泡。短暂离心后，置于冰上按照下表配制反应液。

参考下表配制反应体系：

组分	20ul 体系	终浓度
SYBR Green qPCR Mix	10μl	1×
Primer F (10 μM)*	0.4~0.8 μl	0.2~0.4 uM*
Primer R (10 μM)*	0.4~0.8 μl	0.2~0.4 uM*
50 x ROX Reference Dye**	—	—
cDNA 模板	—	--
RNase-Free ddH_2O	至 20 μl	—

*** 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 uM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度 0.2~0.4 uM 范围内调整引物浓度。**

**** 几种常见仪器的最适 ROX Reference Dye 浓度见下表：**

仪器型号	使用浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/StepOne/ StepOne Plus 等	**5×**
ABI 7500/7500 Fast、QuantStudio ® 3/5、QuantStudio 6/7 Flex、ViiA 7、Stratagene Mx3000P/Mx3005P和Mx4000等	**1×**
Roche、Bio-Rad、Eppendorf 等	**无需添加**

2、盖上或密封反应管/PCR 板，轻轻混匀。短暂离心，确保所有组分都在管/板底。

二、进行 Real-Time PCR 反应

1、建议采用两步法 PCR 反应程序进行反应。

两步法反应程序:

步骤	温度	持续时间	循环数
预变性	95℃	5min	1
变性	95℃	10sec	40
退火延伸数据采集	60℃	30sec	40
熔解曲线分析	根据仪器推荐程序设置		

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。

三步法反应程序:

步骤	温度	持续时间	循环数
预变性	95℃	5min	1
变性	95℃	10sec	40
退火	50-60℃	30sec	40
延伸数据采集	72℃	30sec	40
熔解曲线分析	根据仪器推荐程序设置		

2、上机检测：将反应体系置于荧光定量 PCR 仪中，运行程序收集数据并分析结果。

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。
反应循环数不够	一般设置循环数 40，但过多的循环会增加背景信号，降低数据可信度。
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。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进行实验。增加起始模板使用量。
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。

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
PCR 退火温度太低	建议每次增加 2℃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	反应体积太小会导检测精度下降。请根据定量 PCR 仪推荐的反应体积重新实验。

注意事项：

1、本产品中含有荧光染料 SYBR Green I，保存本产品或配制时应避免强光照射。

2、使用时请上下颠倒轻轻混匀，不要使用振荡器，尽量避免出现泡沫，短暂离心后使用。

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、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 10%。

5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。