

## Fast SYBR qPCR Master Mix

### 通用快速荧光定量 PCR 试剂盒(ROX 单独包装)

产品编号	产品名称	规格
BL1565A	通用快速荧光定量 PCR 试剂盒(ROX 单独包装)	5×1 mL

#### 产品简介:

本产品是采用升级版 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时荧光定量 PCR 的专用试剂, 将新一代热启动 Taq DNA 聚合酶、dNTP、Mg<sup>2+</sup>、SYBR Green I、反应缓冲液和稳定剂等试剂预混成即用的 2× Mix, 可对目标 cDNA 进行快速并具有高特异性的定量检测。采用抗体法热启动 Taq 酶, 高温加热前, 抗 Taq 单克隆抗体与 Taq 酶紧密结合, 抑制 Taq 的聚合酶活性, 从而抑制在低温条件下出现的由引物和模板 DNA 非特异性杂交或引物二聚体引起的非特异性扩增。抗体在 PCR 反应的预变性步骤中会完全失活, 不干扰后续的 Taq 酶聚合反应, 大大提高了 PCR 反应的灵敏度及特异性。

本产品为含 High ROX 的 2×浓度预混反应体系, 使用时只需加入模板、引物和水, 使其工作浓度为 1×, 即可进行反应。最大限度地减少人为误差、降低污染机率、节约实验操作时间, 快速简便、通用性广、灵敏度高、特异性强、稳定性好, 适用于基因组 DNA 和 cDNA 模板的扩增, 对不同 GC 含量 (30%-75%) 基因扩增均有非常高的扩增效率。

#### 产品组成:

编号	组分	规格
BL1565A-1	2×Fast SYBR qPCR Master Mix	1 mL×5
BL1565A-2	ROX Reference Dye(25μM)	200 μL

#### 保存条件:

收到本产品后, 请立即置于-20°C避光保存, 两年有效。避免反复冻融。如果经常使用, 可置于4°C保存至少 3 个月。

#### 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. 反应液的配制、分装请一定使用无污染的气枪头、PCR 管等, 尽量避免交叉污染。
4. 本品不能用于杂交探针法。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品;
6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明:

##### 一、qPCR 反应体系配制:

将所有试剂 2×Fast SYBR qPCR Master Mix, 模板, 引物和 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 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	20 $\mu$ L 体系	50 $\mu$ L 体系
2 $\times$ Fast SYBR qPCR Master Mix	10 $\mu$ L	25 $\mu$ L
正向引物 (10 $\mu$ M) <sup>①</sup>	0.4 $\mu$ L	1 $\mu$ L
反向引物 (10 $\mu$ M) <sup>①</sup>	0.4 $\mu$ L	1 $\mu$ L
DNA 模板 <sup>②</sup>	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
ROX Reference Dye <sup>③</sup>	0.4 $\mu$ L	1 $\mu$ L
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	补足至 20 $\mu$ L	补足至 50 $\mu$ L

①引物: 通常引物浓度以 0.2  $\mu$ M 可以得到较好结果, 可以终浓度 0.1-1.0  $\mu$ M 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下, 可提高引物的浓度; 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度, 由此优化反应体系。为了获得理想的 qPCR 的效果, 扩增片段的长度建议为 80-300 bp。

②模板量: 10-100 ng 基因组 DNA, 或 1-10 ng cDNA 为参照, 因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同, 可对模板进行梯度稀释, 以确定最佳的模板使用量。另外, Two Step RT-PCR 反应的 cDNA (RT 反应液) 作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

③不同仪器 ROX 推荐使用终浓度见下表:

仪器型号	ROX 用量 (50 $\mu$ L 体系)	终浓度
ABI Prism7000/7300/7700/7900HT 和 ABI Step One /ABI Step One Plus 等	1 $\mu$ L (0.6~1.0 $\mu$ L)	500nM (300~500nM)
ABI Prism7500 /7500 Fast, MJ Research Chromo4, Opticon (II), Corbett Rotor Gene 3000 等	0.1 $\mu$ L (0.06~0.1 $\mu$ L)	50nM (30~50nM)
thermal Cycler Dice Real Time System, LightCycler, Smart Cycler System, Corbett Rotor-gene 6000, Agilent Technologies Mx3000P 等	无需添加	

## 二、qPCR 反应条件的设置:

### 1. 标准 qPCR 反应程序:

步骤	温度	持续时间	循环数
预变性	95°C	2 min <sup>④</sup>	
变性	95°C	15 sec	40
退火/延伸 <sup>⑤</sup>	60°C	15-30 sec <sup>⑥</sup>	
熔解曲线分析	根据仪器推荐程序设置		

④在预变性时, 通常设定为 95°C 2 min, 复杂或高 GC 模板适当延长至 5 min。

⑤对于复杂模板、高 GC 含量的扩增子, 建议增加退火和延伸温度至 68°C。

⑥对于 $\geq$ 350 bp 或者高 GC 含量的扩增子, 建议增加延伸时间至 40 s 或更长时间。

### 2. 快速 qPCR 反应程序:

步骤	温度	持续时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	5 sec	40
退火/延伸 <sup>⑤</sup>	60°C <sup>⑥</sup>	10 sec <sup>⑥</sup>	
熔解曲线分析	根据仪器推荐程序设置		

⑤对于复杂模板、高 GC 含量的扩增子, 建议增加退火和延伸温度至 68°C。

⑥延伸时间 $\leq$ 10 s, 可完成至少 300 bp 的扩增, 满足绝大多数的 qPCR 实验。对于 $\geq$ 350 bp 或者高 GC 含量的扩增子, 建议增加延伸时间至 40 s 或更长时间。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.  
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



### 三、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。

#### 常见问题与解决方法：

##### 1. 扩增曲线不好或扩增效率低：

- (1) 模板质量差或浓度低，可提高模板的纯度和浓度；引物设计不合理，重新设计引物。
- (2) 扩增条件不理想，可通过延长延伸时间，降低退火温度改善。
- (3) 如 ROX 加量过高会导致修正后荧光值低，检查 ROX 加量是否正确。

##### 2. 熔解曲线不正常：

- (1) 扩增非特异，熔解曲线不是单峰，可降低引物浓度，也可提高退火温度提高扩增特异性。
- (2) 对于高 GC 复杂模板，部分仪器（如 ABI 7500 仪器）会发生熔解曲线不完整的情况，将熔解温度的上限设定为 99°C 可解决该问题。

##### 3. 扩增重复性差：

- (1) 模板纯度低，抑制 PCR 反应，导致实验的重复性差，可降低模板浓度或将模板纯化后再使用。
- (2) 如使用快速扩增程序出现扩增重复性差，由于部分仪器硬件或控制用的软件原因，退火延伸时间无法设定为 30 s，请根据仪器使用说明书，合理设置退火与延伸时间。

##### 4. 扩增曲线呈锯齿状：

- (1) 部分仪器延伸时间过短时，荧光测定不能充分有效完成，导致扩增曲线呈锯齿状，延长延伸时间可得到改善。
- (2) 反应液体积太小，少于仪器的标准规定的体积进行反应时，会增大荧光测定值的误差，此时应增加反应体积。

##### 5. 基线上飘：

- (1) 模板浓度过高，从而无法计算出正确的 Ct 值，请适当降低模板浓度再进行反应。
- (2) 当模板纯度较低时，所含杂质会抑制 PCR 反应。请降低模板浓度，或将其纯化后再进行使用。

