

Fast SYBR Green qPCR Master Mix

货号: A401

保存: -20°C避光保存两年

货号	规格
A401-01	5 ml
A401-02	5×5 ml

【产品概述】

本产品是使用SYBR GreenI 嵌合荧光法进行qPCR的专用试剂。核心组分是基于化学法修饰的热启动DNA聚合酶，配合针对qPCR优化的反应缓冲液，可以有效抑制非特异性扩增，显著提高扩增效率，从而对靶基因进行准确定量。本产品为2×预混试剂，使用时只需加入模板、引物、ROX Reference Dye（根据qPCR仪选择）和水，使其工作浓度为1×，即可进行反应。

- 使用化学法修饰的热启动酶，提高灵敏度，增强特异性
- 针对qPCR优化的反应缓冲液，增强特异性，减少引物二聚体形成，提高扩增效率，重复性好，可信度高
- 配有适用于不同机型的ROX Reference Dye（调整PCR加样误差引起的管间差异），数据准确

【产品组成】

Component	A401-01 (500rxn/20 μl reaction)	A401-02 (2500rxn/20 μl reaction)
2×Fast SYBR Green qPCR Master Mix ^a	4×1.25 ml	5×A401-01
50×ROX Reference Dye I ^b	200 μl	
50×ROX Reference Dye II ^b	200 μl	

a. 包含热启动酶，dNTPs，Mg²⁺，SYBR GreenI 等

b. 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。不同机型ROX Reference Dye使用情况参见下表：

无需添加 ROX Reference Dye	Bio-Rad iCycler CFX96, CFX384, iQ, iQ5, MyiQ, Opticon, Opticon 2, MiniOpticon, Chromo4; Qiagen Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000; Eppendorf Mastercycler ep realplex, realplex 2 s; Roche Applied Science LightCycler 480; Thermo Scientific PikoReal Cycler; Cepheid SmartCycler; Illumina Eco qPCR; Takara TP-800.
添加ROX Reference Dye I (终浓度为1×)	Applied Biosystems 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne, StepOnePlus.
添加ROX Reference Dye II (终浓度为1×)	Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA7, QuantStudio 3, QuantStudio 5, QuantStudio 6; Stratagene MX3000P, MX3005P, Mx4000.

【推荐qPCR体系 (以20 μl反应体系为例)】

Component	Volume	Final Concentration
2×Fast SYBR Green qPCR Master Mix	10 μl	1×
10 μM Forward Primer	0.4 μl	0.2 μM
10 μM Reverse Primer	0.4 μl	0.2 μM
50×ROX Reference Dye (optional)	0.4 μl	1×
PCR-grade Water	Variable	-
Template	Variable	As Required
Total Volume	20 μl	-

反应体系中各成分的量可根据以下原则进行调整：

- 反应体系中引物终浓度为0.2 μM即可得到较好的扩增效果。当反应性能较差时，引物终浓度可以在0.1 - 0.5 μM范围内进行调整
- qPCR灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确度对最终结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性
- 如模板为未稀释cDNA原液，使用体积不应超过qPCR反应总体积的1/10

【PCR条件】

Step	Temperature	Duration	Cycles
Enzyme activation	95°C	5 min	1
Denaturation	95°C	5 sec	40
Annealing/Extension ^a	65°C	20 sec	
Melt curve ^b	As Required	As Required	1

- a. 退火/延伸时间请根据您使用的Real-time PCR仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整。使用ABI 7700和7900时至少30秒；使用ABI 7000和7300时至少31秒；使用ABI 7500时至少34秒
- b. 仪器类型不同，熔解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认熔解曲线采集程序即可

【注意事项】

- 本品尽量避免反复冻融，以免酶活下降。如每次使用量较少，推荐分装后保存
- 使用前请上下颠倒混匀预混液，请勿涡旋以免产生过多气泡引起反应体系体积变化，进而影响定量结果。预混液经混匀瞬时离心后即可使用
- 由于本品含有荧光染料SYBR GreenI，因此保存预混液，以及配制反应体系时都应尽量避免强光照射
- 由于本品检测灵敏度极高，在配制过程中请使用干净灭菌枪头、反应管，条件容许的实验室推荐使用专用的移液器，避免污染

【常见问题与解决方案】

- **阴性对照中有信号产生**
 - a. 模板或试剂被核酸污染：在进行PCR反应前采取标准的预防措施，以降低污染风险
 - b. 产生引物二聚体：配合熔解曲线进行分析
- **熔解曲线出现多个峰**
 - a. 存在引物二聚体或其他特殊结构：根据设计原则设计合成新的引物
 - b. 引物浓度太高：适当降低引物浓度
 - c. cDNA模板带有基因组污染：重新制备cDNA模板
- **定量PCR无扩增曲线**
 - a. 反应循环数不够：一般设置循环数为40
 - b. 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段
 - c. 确认引物是否降解：长时间未使用的引物可能发生降解，合成新的引物，重复实验
 - d. 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品按最高浓度进行检测
 - e. 模板降解：重新制备模板，重复实验

- **定量PCR扩增曲线不平滑**
 - a. 信号太弱：提高模板浓度重复实验
 - b. ROX类型使用错误：确认所用ROX与机型是否匹配
 - c. 定量PCR反应过程中体积变化：PCR管未盖严导致反应体系蒸发
- **Ct值出现太晚**
 - a. 扩增效率低：优化反应条件，或者重新设计合成引物
 - b. 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品按最高浓度进行检测
 - c. 模板降解：重新制备模板，重复实验
 - d. PCR产物太长：推荐PCR产物长度为80-150 bp
 - e. 反应体系中存在PCR抑制剂：一般为模板引入，加大模板稀释倍数或重新制备模板，重复实验
- **实验重复性差**
 - a. 加样体积不准确：使用准确的移液器；增加模板稀释度，以大体积加入反应体系中
 - b. 模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，减少模板稀释度或提高加样体积
 - c. 定量PCR反应过程中体积变化：PCR管未盖严导致反应体系蒸发

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。



■ 蓉为基因/Exongen Biotech Co., Ltd
■ 咨询热线/400-0800-717
■ 技术支持/support@exongen.com

■ 网址/www.exongen.com
■ 销售/sales@exongen.com
■ 售后/service@exongen.com