

AipMix 2× SYBR Green qPCR SuperMix(Non ROX)

使用说明书

版本号: 240220

包装量:

目录编号	包装单位	产品规格
FP301-01	1.25mL	125次*20uL
FP301-02	4*1.25mL	500次*20uL
FP301-03	40*1.25mL	5000次*20uL

产品储存: 2-8°C运输, -20°C避光保存, 保质期 24 个月。使用前充分融解混匀, 短期使用可放在 4°C存放 3 周, 可反复冻融达 30 次。

适用范围: 本制品用于 DNA 样本的扩增定量, 可以扩增所有物种来源的 DNA, 样本类型可以是基因组 DNA、cDNA、质粒 DNA、λ DNA 等。

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、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。

本制品不含 ROX 参比染料, ROX 主要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。如需添加请自行购买 ROX Reference Dye (100×) (货号为: FP307), 客户可根据 qPCR 仪器技术指导自行决定是否添加 ROX 参比染料和需要添加的浓度。适用机型: Roche Light Cycler 480、Roche Light Cycler 96、MJ Research Chromo

4/Opticon 2、Takara TP-800、Bio-Rad iCycler iQ/iQ5/CF X96/C1000 Thermal Cycler、Qiagen Corbett Rotor-Gene 3000/6000/G/Q、Thermo Scientific Pikoreal 96、Eppendorf Mastercycler ep realplex 等无需添加 ROX 的机型。

建议PCR条件：(以20μL和50μL反应体系为例，反应液配制请在冰上进行)

Components	Volume(20μL)	Volume(50μL)	Final Concentration
2× SYBR Green qPCR Mix (Non ROX)	10μL	25μL	1×
DNA Template	2μL	4μL	as required
Forward Primer (10μM)	0.4μL	1μL	0.2μM each
Reverse Primer (10μM)	0.4μL	1μL	0.2μM each
ddH ₂ O to final volume	20μL	50μL	Not applicable

PCR 循环(二步法):

95°C: 2 min

95°C: 15 sec

60°C: 30-34 sec



40 cycles

Dissociation Stage

PCR 循环(三步法):

95°C: 2 min

95°C: 15 sec

60°C: 15-20 sec

72°C: 20-30 sec



40 cycles

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。

注意事项：

1. 本制品在使用前请轻柔的上下颠倒混匀后进行使用，也可将预混合试剂经短暂离心后混匀进行使用。请勿漩涡振荡混匀，避免产生过量气泡，影响定量结果。
2. 本制品含SYBR® Green I 强光下易分解和降低敏感度，保存和使用时应避免长时间强光照射。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。
3. 本制品含有4mM MgCl₂(反应体系终浓度是2mM Mg²⁺)，可用25mM MgCl₂优化Mg²⁺浓度。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
5. 本产品仅供科研使用，严禁用于临床诊断和药物等用途。

荧光定量PCR实验常见问题和解决方案

Q1: 无信号值出现

- A1.1: 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。
- A1.2: 检测荧光信号的步骤有误。一般 SG 法采用 72°C 延伸时采集，而 TaqMan 法则一般在退火结束时或延伸结束时采集信号。
- A1.3: 引物或探针降解。可通过 PAGE 电泳检测其完整性。
- A1.4: 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。
- A1.5: 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。
- A1.6: 模板降解。避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。

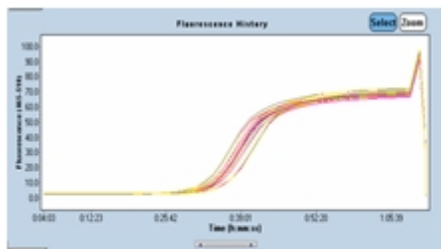
Q2: CT 值出现过晚

- A2.1: 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。
- A2.2: PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足。
- A2.3: PCR 产物太长。一般采用 100-150bp 的产物长度，一般不超过 500bp。

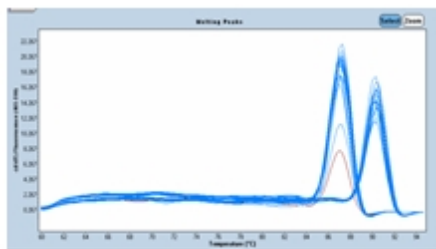
Q3: 标准曲线的线性关系不佳

- A3.1: 加样存在误差，使得标准品不呈梯度。
- A3.2: 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。
- A3.3: 引物或探针不佳。重新设计更好的引物和探针。
- A3.4: 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 三步法实操作图)



扩增曲线



熔链曲线

=====

