

2x SYBR Green qPCR Master Mix

产品组成

| 产品 | Cat #: B21202 | Cat #: B21203 |
|--|--------------------|-----------------------------------|
| 2x SYBR Green qPCR Master Mix ^a | 5 mL (200 Rxns) | 25 mL (1000 Rxns) ^c |
| 50x ROX Reference Dye 1 ^b (High Conc) | 200 µL | 1000 µL |
| 50x ROX Reference Dye 2 ^b (Low Conc) | 200 µL | 1000 µL |

- a. 包含热启动DNA聚合酶, dNTPs, Mg²⁺以及SYBR Green I dye。
b. 用于校正不同孔荧光信号的差异, 需根据不同仪器型号进行添加。

储存条件

所有试剂可于-20°C储存2年。

注意:

对应不同的Real-time PCR仪器选择恰当的ROX:

| | |
|-----------------------------|---|
| 不使用ROX Reference Dye | Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; MiniOpticon™, Cepheid SmartCycler®; Eppendorf Mastercycler® eprealplex, realplex 2s; Illumina Eco™ qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Roche: LightCycler® 480, 96, Nano, 1.5/2.0**; Thermo Scientific PikoReal Cycler. |
| 使用ROX Reference Dye 1 (高浓度) | Applied Biosystems: 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOne Plus™. |
| 使用ROX Reference Dye 2 (低浓度) | Applied Biosystems: 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio 6 and 7 Flex System, QuantStudio 3 and 5; Agilent Stratagene: MX4000™, MX3005P™, MX3000P™. |

使用方法

1. QPCR体系, 以20 µL和50 µL为例:

| 成分 | 每个反应用量 (µL) | 每个反应用量 (µL) | 终浓度范围 |
|-------------------------------|-------------|-------------|----------|
| 2x SYBR Green qPCR Master Mix | 25 | 10 | 1x |
| 模板 ^c | 可变 | 可变 | 1-100 ng |
| 上游引物 ^d (10 µM) | 2.5 | 1 | 0.2-1 µM |
| 下游引物 ^d (10 µM) | 2.5 | 1 | 0.2-1 µM |
| ROX Reference Dye | 1 | 0.4 | 1x |
| 去离子水 | 加至50 | 加至20 | - |
| 总反应体系 ^e | 50 | 20 | - |

c. 模板添加量因模板溶液中存在的靶基因的拷贝数不同而不同, 最好进行梯度稀释以确定最佳的模板添加量, 一般添加量不超过总体系的10%。推荐模板量为1 µg RNA (10 µL反转体系)的逆转录产物稀释10倍使用, 通常20 µL QPCR体系中加入1 µL。对于低丰度基因, 通常要适当提高QPCR体系中的模板量。

d. 一般情况下, 上下游引物终浓度在0.5 µM时, 能得到较好的效果。当反应性能较差时, 可在0.2-1 µM间摸索最适引物浓度。若是扩增效率过低, 可适当提高引物浓度; 若是反应特异性不佳时, 可适当降低引物浓度。

e. 该产品也可以用于10 µL的反应体系, 但对于低丰度基因, 建议使用20 µL以上体系。

2. QPCR程序设置

本品适合两步法和三步法程序, 通常三步法效果更佳。当反应性能较差时, 可进行以下调整, 若是扩增效率不佳, 可适当延长热启动时间、降低退火温度或增加延伸时间; 若是扩增特异性不佳, 可适当提高退火温度。

| 两步法 | 1 | | 2 | | 3 | | |
|--------|--------------------------------|-----------------------|-----------------|-------|-----------------|------------|---------|
| | Step | Hot-Start DNA Polymer | | PCR | | Melt Curve | |
| Step | HOLD | CYCLE (40 cycles) | | | CYCLE (1 cycle) | | |
| | | Denatur | Anneal / Extend | | | | |
| Temp. | 95.0 °C | 95.0 °C | 60.0 °C | | 95.0 °C | 60.0 °C | 95.0 °C |
| Time | 30 sec -10 min ^f | 15 sec | 30-60 sec | | 15 sec | 60 sec | 15 sec |
| Volume | 50 µL | | | 50 µL | | | |



| 三步法 Step | 1 | 2 | | | 3 | | |
|-------------|--|-------------------|--------------|---------|-----------------|---------|---------|
| | Hot-Start DNA Polymerase Activation | PCR | | | Melt Curve | | |
| | HOLD | CYCLE (40 cycles) | | | CYCLE (1 cycle) | | |
| | | Denatur | Anneal | Extend | | | |
| Temp. | 95.0 °C | 95.0 °C | 50.0-60.0 °C | 72.0 °C | 95.0 °C | 60.0 °C | 95.0 °C |
| Time | 30 sec- 10 min ^f | 15 sec | 30 sec | 30 sec | 15 sec | 60 sec | 15 sec |
| Volume | | 50 µL | | | 50 µL | | |

f. 95°C加热30 sec-10 min激活热启动DNA聚合酶，如果扩增序列富含GC，需要延长至10 min。

结果分析

扩增曲线：一般CT值的正常范围为15-35之间，其中20-28之间的定量最为准确。如果CT值过小，则需重新稀释模板；如果CT值过大，则需适当提高模板浓度、提高引物浓度以及调试最佳QPCR程序。

溶解曲线：通常只有溶解曲线为单峰时，才为有效定量结果。如果溶解曲线出现多峰，则需优化条件重新实验，常见方法通常需要重新设计引物等。

常见问题

| 问题 | 可能的原因 | 建议改进 |
|----------------|----------------|------------------------------------|
| 阴性对照中出现明显的扩增结果 | 所使用的试剂或去离子水被污染 | 更换新的试剂及去离子水并保证在洁净的实验台上进行试验 |
| | 引物二聚体 | 35个循环之后阴性对照出现明显扩增是正常的，应该结合溶解曲线进行分析 |
| Ct值明显过高或过低 | 低扩增效率 | 优化反应体系，尝试三步法或重新设计引物 |
| | 模板浓度太低 | 增大模板浓度 |
| | 模板发生降解 | 制备新鲜的模板 |
| | 扩增片段太长 | 扩增片段的长度建议为100-200 bp |
| | 反应体系中存在PCR抑制物 | 抑制物往往由于模板的加入而引入，可以稀释模板或者重新制备模板 |

| 问题 | 可能的原因 | 建议改进 |
|----------|----------------|--|
| 扩增曲线形状异常 | 扩增曲线形状异常 | 信号较弱时系统的校正会导致此结果，可以通过提高模板浓度改进 |
| | 断裂或下降的扩增曲线 | 模板浓度太高，基线的终点值高于Ct值，可以减小基线的终点值（Ct值-4）并且重新分析数据 |
| | 扩增曲线突然下降 | 反应体系中存在气泡并且在温度升高的时候突然破掉，设备会探测到突然的荧光值下降，可以离心并检查是否存在气泡 |
| 无扩增曲线 | 循环数不足 | 循环数一般设为40 |
| | 循环程序中不存在信号收集程序 | 两步法中信号收集是设定在退火和延伸步骤；三步法中信号收集应该设定在72°C延伸步骤 |
| | 引物降解 | 长期储存后应该通过PAGE胶确定引物的完整性 |
| | 模板浓度太低 | 降低稀释比（对于未知表达情况的目的基因，首次检测采用模板原液） |
| | 模板降解 | 制备新鲜模板 |
| 溶解曲线杂峰 | 引物设计不合理 | 引物二聚体的杂峰常出现在75°C左右，如该峰值显著，需要重新设计引物 |
| | 引物浓度过高 | 适当降低引物浓度 |
| | 模板浓度过低 | 适当增加模板浓度 |
| | 基因组DNA污染 | 跨内含子设计引物 |
| 复孔稳定性差 | 加样误差 | 增大反应体系；增加模板稀释倍数，同时提高加样体积 |
| | 模板浓度过低 | 提高加样量 |
| | 仪器问题 | 仪器各孔之间温度有差异，需校准仪器后使用 |

