

# 2x SYBR Green qPCR Master Mix (Low ROX)

## 产品组成

| 产品   | Cat #: B21702   | Cat #: B21703     |
|--|-----------------|-------------------|
| 2x SYBR Green qPCR Master Mix (Low ROX) <sup>a</sup> | 5 mL (200 Rxns) | 25 mL (1000 Rxns) |

a. 包含热启动DNA聚合酶, dNTPs, Mg<sup>2+</sup>, SYBR Green I dye以及低浓度ROX。

## 储存条件

所有试剂可于-20℃储存2年。

### 注意:

该产品适用于下列仪器:

|           |   |
|-----------|---|
| 使用低浓度的ROX | Applied Biosystems: 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio 6 and 7 Flex System, QuantStudio 3 and 5; Agilent Stratagene: MX4000™, MX3005P™, MX3000P™. |
|-----------|---|

如果使用如下仪器, 请选用Selleck SYBR Green Master Mix, 货号: **B21202**, **B21203**和**B21204**:

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| 不使用ROX Reference Dye        | <b>Bio-Rad</b> CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™ 5, MyiQ™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; MiniOpticon™,<br><b>Cepheid</b> SmartCycler®;<br><b>Eppendorf</b> Mastercycler® eprealplex, realplex 2s;<br><b>Illumina</b> Eco™ qPCR;<br><b>Qiagen/Corbett</b> Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000;<br><b>Roche</b> : LightCycler® 480, 96, Nano, 1.5/2.0**;<br><b>Thermo Scientific</b> PikoReal Cyclers. |
| 使用ROX Reference Dye 1 (高浓度) | <b>Applied Biosystems</b> : 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOne Plus™.   |

## 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 Selleck SYBR Green Master Mix | 25          | 10          | 1x       |
| 模板 <sup>c</sup>                  | 可变          | 可变          | 1-100 ng |
| 上游引物 <sup>d</sup> (10 μM)        | 2.5         | 1           | 0.2-1 μM |
| 下游引物 <sup>d</sup> (10 μM)        | 2.5         | 1           | 0.2-1 μM |
| 去离子水                             | 加至50        | 加至20        | -        |
| 总反应体系 <sup>e</sup>               | 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。

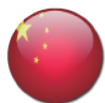
d. 一般情况下, 上下游引物终浓度在0.5 μM时, 能得到较好的效果。当反应性能较差时, 可在0.2-1 μM间摸索最适引物浓度。若是扩增效率过低, 可适当提高引物浓度; 若是反应特异性不佳时, 可适当降低引物浓度。

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。

|             | 1                                   | 2                 |                 | 3               |         |         |
|-------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|---------|---------|
| <b>两步法</b>  | Hot-Start DNA Polymerase Activation | PCR               |                 | Melt Curve      |         |         |
| <b>Step</b> |                                     |                   |                 |                 |         |         |
|             | 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 <sup>1</sup>         | 15 sec            | 30-60 sec       | 15 sec          | 60 sec  | 15 sec  |
| Volume      | 50 μL                               |                   |                 | 50 μL           |         |         |



订购 & 咨询

Tel: 400-668-6834

Email: info@selleck.cn

|             | 1  | 2                 |              |         | 3               |         |         |
|-------------|--|-------------------|--------------|---------|-----------------|---------|---------|
| 三步法<br>Step | Hot-Start<br>DNA<br>Polymerase<br>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-<br>10 Min <sup>f</sup>               | 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，如改峰值显著，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                                 |

