

ABKuniversal SYBR Green qPCR Mix

产品信息

产品组成	ABK0003M
2 x SYBR qPCR Mix	1.25 mL*4
RNase free H2O	1.25 mL*4
100X ROX Reference Dye	100 μ L

产品存储

-20 °C 避光保存至少 12 个月，使用前充分融解混匀。短期使用可放在 4 °C，避免反复冻融。

产品简介

产品将采用 SYBR® Green I 嵌合荧光法进行实时荧光定量检测。试剂盒预先将热启动聚合酶、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，使用时只需加入模板和引物和水，便可在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。本品采用改良的 Hotmaster Taq DNA 聚合酶，该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

注意事项:

1. 客户根据qPCR仪器技术指导决定是否需要加ROX参比染料，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。
2. 本产品含SYBR® Green I 强光下易分解，降低敏感度，使用时避免长时间强光照射本制品。
3. 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。

本产品含有 4 mM MgCl₂（反应体系终浓度是 2 mM Mg²⁺），可用 25mM MgCl₂ 优化 Mg²⁺浓度

实验步骤

以 20, 50 μL 反应体系为例, 推荐的 PCR 反应条件 (反应液配制请在冰上进行)

成分	体积 (20 μL)	体积 (50 μL)	终浓度
2 x SYBR qPCR Mix	10 μL	25 μL	1 \times
cDNA 模板	1 μL	2 μL	as required
Forward Primer (10 μM)	0.4 μL	1 μL	0.2 μM each
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μL	1 μL	0.2 μM each
ddH ₂ O to final volume	20 μL	50 μL	Not applicable

PCR 循环 (二步法)

95°C 2 min

95°C 15 sec

60°C 30-34 sec

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

Dissociation Stage



注: 本产品兼容性强, 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。如果融解曲线较差, 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。不同仪器 ROX 推荐使用终浓度(50 μL 反应体系举例):

Instrument	ROX (100 \times) Per 50 μL PCR Reaction	Final Concentration
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT and 7900HT Fast, ABI Step One, ABI Step One Plus	0.5 μL	1 \times
ABI 7500, 7500 Fast, Stratagene Mx3000P, Mx3005P, Mx4000, ABI QuantStudio Dx/3/5, ABI QuantStudio 6/7/12K Flex, ABI ViiA7	0.05 μL *	0.1 \times
Roche LightCycler 480, Roche Light Cyclus 96, MJ Research Chromo4, MJ Research Opticon 2, Takara TP-800, Bio-Rad iCycler iQ, Bio-Rad iCycler iQ5, Bio-Rad CF X96, Bio-Rad C1000 Thermal Cycler, Thermo Scientific Pikoreal 96, Qiagen Corbett Rotor-Gene 6000, Qiagen Corbett Rotor-Gene G, Qiagen Corbett Rotor-Gene Q, Qiagen Corbett Rotor-Gene 3000, Mastercycler ep realplex	NO need to use ROX	

从配制 PCR 反应的水溶液中减去 Rox 染料的体积。

* 为使每个反应精确加入小体积的 Rox (0.05 μL), 推荐使用前将 ROX (100 \times) 储存液用 PCR 级水稀释 20 倍后使用, 这样可以精确吸量小体积溶液。

荧光定量 PCR 实验常见问题和解决方案

A1: 无信号值出现

Q1: 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。

检测荧光信号的步骤有误。一般 SG 法采用 72°C 延伸时采集, Taqman 法则一般在退火结束时或延伸结束采集信号。

引物或探针降解。可通过 PAGE 电泳检测其完整性。

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。

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。

模板降解。避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。

A2: CT 值出现过晚

Q2: 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。

PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足。

PCR 产物太长。一般采用 100-150bp 的产物长度, 一般不超过 500bp。

A3: 标准曲线的线性关系不佳

Q3: 加样存在误差, 使得标准品不呈梯度。

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。

引物或探针不佳。重新设计更好的引物和探针。

模板中存在抑制物, 或模板浓度过高。