

SYBR qPCR SuperMix

一. 产品简介:

本品是采用SYBR Green I嵌合荧光法进行qPCR的2×浓度预混型试剂。本品使用新型的热启动Taq DNA Polymerase，配以针对qPCR最优化的反应缓冲液及多种特异性促进因子，具有特异性强，PCR扩增效率高，可以进行高灵敏度的realtime PCR反应。本制品中预混了特定的ROX试剂，适应于所有qPCR仪器，无需在不同仪器上配备不同浓度的ROX，只需在配制反应体系时加入引物和模板即可进行扩增。

二. 订购信息

产品名称	货号	规格
SYBR qPCR SuperMix	MB0009	1mL×5
	MB0010	1mL×25

三. 保存条件:

-20℃避光储存。

四. 使用说明:

反应体系配制	
SYBR qPCR SuperMix	10μL
上游引物	0.4μM
下游引物	0.4μM
模板	100ng
RNase Free Water	补足至20μL

- 1、通常引物终浓度为0.4μM可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.2-1.0μM范围内调整引物浓度。
- 2、建议在20μL反应液中使用相当于10pg-100ng Total RNA量的cDNA为模板。反转录反应液的加入量不能超过PCR反应液总体积的10%。

两步法反应程序设置			
反应阶段	循环数	温度	时间
预变性	1	95℃	30s
变性	40	95℃	5s
退火/延伸		60℃	30s
溶解曲线	使用仪器默认溶解曲线采集程序		

- 3、如果需要提供反应特异性，可以提高退火温度（60℃-64℃）。
- 4、通常使用两步法进行PCR反应，当使用两步法 PCR 反应扩增效率较差时，可以尝试进行三步法PCR 扩增反应。其程序为：

三步法反应程序设置

反应阶段	循环数	温度	时间
预变性	1	95°C	30s
变性	40	95°C	5s
退火		55°C	30s
延伸		72°C	30s
溶解曲线	使用仪器默认溶解曲线采集程序		

Q&A

Q: 无CT值出现

- A: 1) 检测荧光信号的步骤有误: 一般染料法采用72°C延伸时采集, 探针法则一般在退火结束时或延伸结束采集信号。
- 2) 引物或探针降解: 可通过电泳检测其完整性。
- 3) 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。
- 4) 模板降解: 避免杂质的引入及反复冻融, 必要时可以重新制备模板。

Q: CT值出现过晚(CT>38)

- A: 1) 扩增效率低, 反应条件不够优化: 设计更好的引物或探针; 适当降低退火温度; 改为三步法扩增。
- 2) PCR各种反应成分降解或上样量不足: 更换试剂或加大上样量, 重复实验。
- 3) PCR产物太长: 一般采用80bp~150bp的产物长度。
- 4) 热启动时间过短, 酶活性中心没有完全暴露, 活性发挥受到了影响: 建议热启动时间不低于1min。

Q: 标准曲线线性关系不佳

- A: 1) 加样存在误差, 导致标准品不呈梯度: 重新加样并重复实验。
- 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。
- 3) 引物或探针不佳: 重新设计更好的引物和探针。
- 4) 模板中存在抑制物, 或模板浓度过高: 更换模板或提高模板稀释倍数。

Q: 扩增曲线异常, 如断裂或者锯齿状曲线?

- A: 1) 模板的浓度太高/降解或荧光染料发生了降解: 建议更换模板或Mix。
- 2) 反应管内有气泡: 混匀后离心, 避免气泡的残留。
- 3) 程序设置时间不当: 适当延长延伸时间(40~60s), 充分收集荧光信号。

Q: 负对照有信号

- A: 1) 引物设计不够优化: 应避免引物二聚体和发夹结构的出现。
- 2) 引物浓度不佳: 适当降低引物的浓度, 并注意上下游引物的浓度配比。
- 3) 模板有基因组的污染: RNA提取过程中避免基因组DNA的引入, 可以稀释模板的浓度或者更换模板。
- 4) 反应体系污染: 更换Mix、水或者引物等, 避免交叉污染。

Q: 溶解曲线不止一个主峰

- A: 1) 引物浓度过高或者设计不够优化: 应降低引物浓度或者重新设计引物, 避免产生引物二聚体。
- 2) 体系被污染: 更换试剂后重复实验。
- 3) 反应条件不够优化, 引起非特异性扩增: 设计特异性更高的引物或探针; 适当提高退火温度。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use. This product is not a medical device.
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。