

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) ^a	5 mL (200 Rxns)	25 mL (1000 Rxns)

a. 包含热启动DNA聚合酶, dNTPs, Mg²⁺, 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Bimake SYBR Green Master Mix，货号：**B21202**，**B21203**和**B21204**：

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 Cyclor.
使用ROX Reference Dye 1 (高浓度)	Applied Biosystems : 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 Bimake™ SYBR Green 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
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。

	1	2		3		
两步法	Hot-Start DNA Polymerase Activation	PCR		Melt Curve		
Step		CYCLE (40 cycles)		CYCLE (1 cycle)		
	HOLD	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 [†]	15 sec	30-60 sec	15 sec	60 sec	15 sec
Volume	50 μL			50 μL		



	1	2			3		
三步法 Step	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

