



扫描二维码打开中科瑞泰官网  
www.real-times.com.cn

Ver.711274

## 2×SYBR qPCR MasterMix (Universal)

### 产品编号及规格:

组成	RTQ3101-02 (可做 40 次 50 μl 反应)	RTQ3101-03 (可做 200 次 50 μl 反应)	RTQ3101-04 (可做 1000 次 50 μl 反应)
2×SYBR qPCR MasterMix	1ml	5×1ml	25×1ml
RNase-free water	1 ml	5×1 ml	25×1 ml

注: 以50 μl qPCR反应体系为例, 每次使用25 μl 2×MasterMix, 1 ml可做40次 50 μl qPCR反应。

### 储存条件:

长期保存请于-20℃避光保存, Mix融解后可在4℃避光条件下稳定存放一个月, 尽量避免反复冻融。

### 产品简介:

本制品是采用SYBR Green I嵌合荧光法进行Real Time PCR的专用试剂。已经将 Hot-Start DNA聚合酶、dNTP、特殊稳定剂、优化的反应缓冲液和 SYBR Green I 等试剂预混成一种适合 Real Time PCR反应检测用 2×MasterMix试剂, 具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。

本制品使用新型抗体修饰的 HotStart Taq DNA聚合酶, 并结合精心优化的反应 Buffer, 从而有效抑制低温下的非特异性扩增, 提高反应特异性和扩增效率, 能够在更广泛的范围内进行准确定量。使用时只需加入模板、引物和水, 便可在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线, 对目的基因进行准确定量检测, 重复性好, 可信度高。

预混液中含有优化的校正染料, 与一系列 qPCR设备兼容, 包括需要ROX校正的仪器, 实验操作过程中不需要额外添加校准染料来校正仪器。

### 使用方法:

1. 冰浴中彻底融化2×qMasterMix, 避免涡旋震荡, 以免产生过多气泡, 彻底混匀后快速离心将溶液收集到管底。

2. 建议的qPCR反应体系:

	50 μl 反应体系	20 μl 反应体系	终浓度
2×qPCR MasterMix	25 μl	10 μl	1×
上游引物 10 μM	1 μl	0.4 μl	0.2 μM
下游引物 10 μM	1 μl	0.4 μl	0.2 μM
模板	x μl	x μl	10pg-100ng
水	补至 50 μl	补至 20 μl	

注:

- 推荐模板加样量为1-2 μl, 如模板类型为未稀释cDNA原液, 模板添加量不应超过总反应体系的10%。不同种类DNA模板中含有的靶基因拷贝数目不同, 必要时可进行梯度稀释, 以确定最佳的DNA模板添加量。
- 通常推荐的引物终浓度为0.2 μM, 反应效果不佳时可在0.1-1 μM范围内进行调整

3. qPCR程序:

检测片段大于300 bp, qPCR仪上推荐执行以下程序(三步法):

步骤	温度	时间	循环数
初始变性	95℃	30 sec*	1
变性	95℃	15 sec	40
退火	55-65℃	30 sec	
延伸	72℃	30 sec	
熔解曲线	使用机器默认采集程序		

检测片段小于300 bp, qPCR仪上推荐执行以下程序(两步法):

步骤	温度	时间	循环数
初始变性	95℃	30 sec*	1
变性	95℃	15 sec	40
退火和延伸	60℃	60 sec	
熔解曲线	使用机器默认采集程序		

## 使用注意事项:

1. 本制品中已经含有优化的校正染料, 客户无需再添加校正染料, 可以直接使用。
2. 本制品含SYBR Green I, 强光下易分解, 使用时避免长时间强光照本制品。
3. 建议在冰上配制qPCR反应液, 再放入qPCR仪器中扩增, 可以提高扩增特异性, 减少背景。
4. -20℃下保存时间较长, 有微量沉淀产生, 充分混匀后不影响使用。本制品已经优化了反应缓冲液中的Mg<sup>2+</sup>浓度, 无需再调节Mg<sup>2+</sup>浓度。
5. 模板DNA: cDNA、基因组DNA、质粒DNA、病毒DNA等都可作为模板。在添加DNA模板时请注意模板量对PCR扩增的影响。本产品建议添加量为: cDNA添加量不应超过总反应体系的10%; 基因组DNA为模板时, 为避免在高浓度区域出现线性差的情况, 请注意添加量小于500 ng; 病毒DNA为PCR模板, 添加时请以300 ng为上限; 由于质粒DNA浓度和拷贝数很高, 在添加PCR模板之前最好进行稀释梯度试验, 以便确定合适的质粒DNA拷贝数。
6. 引物:  
建议每条引物工作浓度0.2 μM-0.8 μM;  
为得到高灵敏度定量性的数据, 引物设计非常重要。

以下列举了设计引物时需注意的一般事项。

- a) 引物长度请设定为18bp-30 bp、GC含量为40%-65%;
- b) 扩增片段一般小于300 bp, 请尽量设定在80 bp-150 bp。过长的片段容易导致扩增效率降低;
- c) 如设计mRNA为目的片段的引物, 设计应尽量横跨内含子, 以防止基因组DNA扩增而引起假阳性;
- d) 请尽量选择Tm为65℃-67℃;
- e) A、G、C、T整体分布尽量均匀。不要有部分的GC rich或AT rich(特别是3'端)。避开T/C(Polypyrimidine)或A/G(Polypurine)的连续结构
- f) 避免引物内部或两条引物之间有3个碱基以上的互补序列。二条引物间的3'末端避开有2个碱基以上的互补序列;
- g) 引物设计完成后要使用BLAST检索确认引物的特异性。  
此外, 引物的纯化纯度对反应特异性有很大的影响。经过一般纯化、纯度较低的引物荧光强度散乱, 容易产生非特异性产物, 致使溶解曲线出现杂峰。请尽可能使用PAGE纯化或HPLC级别纯化, 至少要用经Cartridge(OPC)级别以上纯化的引物。

## 常见问题:

问题	可能原因	解决方法
无扩增曲线且无扩增产物 (凝胶电泳)	反应体系中有PCR反应抑制剂	更换或纯化模板DNA
	引物设计不合理	重新设计、合成引物
	逆转录产物体积过量	减少逆转录产物量不超过反应体系的10%
	加样错误或有试剂未加	检查是否加了所有的所需试剂
	引物的降解	通过PAGE电泳检测引物完整性
无扩增曲线但有扩增产物 (凝胶电泳)	退火温度不正确	优化退火温度
	qPCR仪设置不正确	检查reference dye是否选择正确
空白对照出现信号	荧光信号采集设置错误	两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火&延伸阶段, 三步法扩增程序应当将信号采集设置在72℃延伸阶段
	反应体系中有污染	qPCR片段较小, 极易造成环境中气溶胶污染。如果融解曲线分析, 解链温度和目的片段相同, 凝胶电泳空白对照中的片段大小和目的片段相同, 极有可能是反应体系中某一或某些试剂污染所引起的。建议换至没有污染源的环境进行PCR体系的配制。
Ct值出现过晚	出现引物二聚体等非特异扩增	一般在35循环以后空白对照出现扩增产物属正常情况, 应配合片段溶解曲线进行分析重新设计引物。
	模板浓度过低; 扩增产物过长	提高模板浓度; 产物长度控制在80-200bp