



2 x Dual Sybr Green qPCR Mix(Universal ROX)

地 址：武汉市新技术开发区高新大道 666 号 2 栋
电 话：15572895186（微信同号）
网 址：www.keepbio.cn 技术 QQ：781634607

使用说明书

包 装 量：

目录编号	包装单位
PC6201	100次×20 μl
PC6202	500次×20 μl

组成	PC6201	PC6202
2 x Dual SYBR qPCR Mix	1.25ml	1.25ml x 4

产品组成、储存、浓度：

储存：-20℃ 避光保存至少 12 个月。经常使用，解冻后可置于 4℃ 保存至少 6 个月，避免多次冻融。

制品说明：本制品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用 2 x 预混试剂。采用科尔普特异的新型双封闭 HotStart Taq DNA Polymerase，配以特异的双阳离子缓冲液和多种特异性促进因子，增强特异性，减少引物二聚体的形成，使得结果更加准确可靠。本制品已加入特殊的通用 ROX 参比染料，适应于所有 qPCR 仪器，无需在不同的仪器上调整 ROX 的浓度，只需在配制反应体系时加入引物和模板即可进行扩增。

注意事项：

1. 本制品已加入特殊的通用ROX参比染料，具有高通用性，可用于各种仪器。无论是需要添加ROX的仪器（如ABI 的各种需要高ROX或者低ROX机型），还是不需要添加ROX的仪器（如Roche Light Cycler、Bio-Rad CFX96等机型），均适用于本制品。
2. 使用前请轻柔上下颠倒以混匀Master Mix，请勿vortex避免产生过量气泡，影响定量结果。Master Mix经混匀短暂离心后即可使用。。
3. 本制品含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。
4. 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。

建议PCR条件(以25, 50 μl反应体系为例，反应液配制请在冰上进行)

Components	Volume (20 μl)	Volume (50 μl)	Final Concentration
2 x Dual SYBR qPCR Mix	10 μl	25 μl	1×
DNA Template	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



40 cycles

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



40 cycles

Dissociation Stage

说明：本制品兼容性强，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。如果融链曲线较差，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。

荧光定量 PCR 实验常见问题和解决方案

Q1: 无信号值出现

A1:

1. 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。
2. 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。
3. 引物或探针降解。可通过 PAGE 电泳检测其完整性。
4. 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。
5. 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。
6. 模板降解。避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。

Q2: CT 值出现过晚

A2:

1. 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。
2. PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足。
3. PCR 产物太长。一般采用 100-150bp 的产物长度，一般不超过 500bp。

Q3: 标准曲线的线性关系不佳

A3:

1. 加样存在误差，使得标准品不呈梯度。
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。

Q4: 阴性对照也出现明显扩增

A4:

1. 反应体系或者水被污染：更换新的 Mix 或者水重复试验。反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染。
2. 引物二聚体的出现：一般在 35 循环以后阴性对照出现扩增属正常情况，可配合融解曲线进行分析。