



武汉科尔普生物科技有限公司

Keep Biotechnologies Co., Ltd

2 x Sybr Green qPCR Mix (High 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

包装量：

目录编号	包装单位
PC6101	125次×20 μl
PC6102	500次×20 μl

组成	PC6101	PC6102
2 x SYBR qPCR Mix (High ROX PreMixed)	1.25 ml	1.25 ml x 4

产品组成、储存、浓度：

储存：-20℃ 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℃，避免反复冻融。

制品说明： 本制品是采用 SYBR® Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。已经将热启动 HotMaster Taq DNA 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，具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。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，对目的基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。本品采用全新的 Hotmaster Taq DNA 聚合酶，该酶不同于一般 Hot-start 酶之处在于，一般的 Hot-start 酶只在第一步温度升高之前封闭酶的活性，而 Hotmaster Taq DNA 聚合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℃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移动，因此最大限度的减少 PCR 扩增全程中的非特异性扩增产物产生，大大提高了荧光定量 PCR 反应的精确性。

注意事项：

1. 本制品已加入高浓度的ROX参比染料，适用于ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT and 7900HT Fast, ABI Step One, ABI Step One Plus以及其它需要高浓度ROX机型。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。
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。
4. 本制品含有4 mM MgCl₂（反应体系终浓度是2 mM Mg²⁺），可用25mM MgCl₂ 优化Mg²⁺浓度。

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 SYBR qPCR Mix(High ROX)	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。