

SP 2× qPCR SmArt Mix (SYBR Green) (No Rox)

产品描述

本产品是高特异型，采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行的 Real Time PCR 专用试剂，组份中含有 Real Time PCR 反应中合适浓度的 SYBR Green I，是一种 2×浓度的预混试剂，PCR 反应液配制十分简单，使用时仅需加入模板、引物和 ddH₂O 调至为 1×即可。

本试剂中使用了抗 Taq 抗体修饰的 Hot Start 法 DNA 聚合酶，与优化的 PCR Buffer 组合，可以有效的抑制非特异扩增，提高 PCR 扩增效率，对靶基因进行准确定量、检测，重复性好，可信度高。

本制品 Buffer 经过改良，配方添加了有效抑制非特异性 PCR 扩增的因子，可以有效抑制样品准备过程中引物退火导致的非特异性扩增，在宽广的范围内进行更加准确的定量。本产品为高特异型预混液，特异性较好，可以有效减少假阳性。

产品组份

产品名称	产品编号	规格
SP 2× qPCR SmArt Mix (SYBR Green) (No Rox)*	DY20307	5*1 mL

*.包含 dNTPs、Mg²⁺、HS-Taq DNA Polymerase、SYBR Green I 等

保存条件

≤0°C运输，-30~-15°C保存，有效期 2 年。

本产品避免反复冻融。产品中含有 SYBR Green I 荧光染料，使用及保存时需注意避光。

产品特点

特异性好：抗 Taq 抗体修饰的 Hot Start 法 DNA 聚合酶，与优化的 PCR Buffer 双重作用大大降低了引物二聚体的产生。

操作简单：操作简单、方便，可迅速完成定量 PCR 预混实验进行上机检测。

重复性好：重复组组内差异小，复孔孔间一致性高，具有较强重复性。

适用性强：已通过 Roche LightCycler™系列和 Bio-Rad CFX 全系列荧光定量 PCR 系统进行验证，适配性高，数据准确。

应用范围广：用于 DNA 样本的定量扩增，可以扩增所有物种来源的 DNA，样本类型可以是基因组 DNA、cDNA、质粒 DNA、λ DNA 等。

质量控制

以 HeLa 细胞总 RNA 的逆转录产物稀释液为模板，扩增不同基因，每个基因的融解曲线为单峰，特异性高，重复性好，扩增曲线在批次间的产品中相近。

操作说明

1.反应体系：(以 ABI 7500 机型为例)

组分	体积 (50 μL)	体积 (20 μL)
SP 2× qPCR SmArt Mix	25 μL	10 μL
上游引物 (10 μM)	1 μL	0.4 μL
下游引物 (10 μM)	1 μL	0.4 μL
Template DNA	X μL	X μL
ddH ₂ O	补足至 50 μL	补足至 20 μL

反应体系中各组分可以根据如下原则进行调整：

1) 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 μM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度 0.1 ~ 1 μM

范围内调整引物浓度。

2) qPCR 灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。

3) 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。cDNA 原液建议 5-10 倍稀释，最佳模板量以扩增得到的 CT 值在 20-30 左右。

2.反应程序设定：

1) 两步法

Stage 1	预变性	Reps: 1	95 °C	3 min
Stage 2	循环反应	Reps: 40	95 °C	10 sec
			60 °C * a	30 sec
Stage 3	溶解曲线**	Reps: 1	仪器默认设置	

2) 三步法

Stage 1	预变性	Reps: 1	95 °C	3 min
Stage 2	循环反应	Reps: 40	95 °C	10 sec
			60 °C a	30 sec
			72 °C *	20sec
Stage 3	溶解曲线**	Reps: 1	仪器默认设置	

*：此步骤采集荧光信号。

**：仪器类型不同，溶解曲线采集程序不同，请使用仪器默认程序，95°C采集溶解曲线荧光信号。

a：根据引物的 T_m 值进行退火（退火/延伸）温度的设定。

常见问题与解决方案

1.扩增曲线形状异常

- 1) 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统矫正后产生。提高模板浓度重复实验。
- 2) 扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于 Ct 值。减小基线终点（Ct 值-4），重新分析数据。
- 3) 个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡。处理样本时要注意离心，进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

2.反应结束无扩增曲线出现

反应循环数不够：一般设置循环数为 40，但需要注意的是过多的循环会增加过多的背景信号，降低数据可信度。

确认程序中是否设置了信号采集步骤：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°C 延伸阶段。

确认引物是否降解：长时间未用的引物应先通过 PAGE 电泳检测完整性，以排除其降解的可能。

模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。

模板降解：重新制备模板，重复实验。

3.Ct 值出现太晚

- 1) 扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计合成引物。
- 2) 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- 3) 模板降解：重新制备模板，重复实验。
- 4) PCR 产物太长：推荐长度为 80 bp~150 bp。
- 5) 体系中存在 PCR 抑制剂：一般为模板带入，加大模板稀释倍数或重新制备模板重复实验。

4.阴性对照出现明显扩增

- 1) 反应体系污染：更换新的 Mix、水和引物重复实验。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：配合融解曲线进行分析。

5.绝对定量时标准曲线线性关系不佳

- 1) 加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积。
- 2) 标准品降解：重新制备标准品，重复实验。
- 3) 模板浓度太高：提高模板稀释倍数。

6.融解曲线出现多峰

- 1) 引物设计不优：根据设计原则设计合成新的引物。
- 2) 引物浓度太高：适当降低引物浓度。
- 3) cDNA 模板带有基因组污染：重新制备 cDNA 模板。

7.实验重复性差

- 1) 加样体积失准：使用性能较好的移液器；将模板做高倍稀释，以大体积加入反应体系中。
- 2) 定量 PCR 仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。
- 3) 模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，减少模板稀释度或提高加样体积。

产品名称	产品编号	已测试机型
SP 2 × qPCR SmArt Mix (SYBR Green) (No Rox)	DY20307	Bio-Rad CFX 全系列
SE 2 × qPCR SmArt Mix (SYBR Green) (No Rox)	DY20306	Roche LightCycler™系列

本产品仅作科研用途