

2 x Sybr Green qPCR Mix (With 100×ROX)



北京艾德莱生物科技有限公司
Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

地址：北京市海淀区上地紫成创业园 C126--130

电话：010-82796972/82795296 (Fax)

网址：www.aidlab.cn 技术 QQ：328153626

使用说明

包装量：

目录编号	包装单位
PC5901	50次
PC5902	200次

组成	PC5901	PC5902
2 x SYBR qPCR Mix	1.25 ml	1.25 ml x 4
ROX Reference Dye (100×)	25 µl	100 µl

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. 本制品含独立包装参比染料 ROX（货号为 PC38 Rox Reference Dye），客户并根据 qPCR 仪器技术指导决定是否需加 ROX 参比染料和加入浓度，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 25 mM 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)

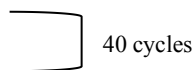
Components	Volume (25 µl)	Volume (50 µl)	Final Concentration
2 x SYBR qPCR Mix	12.5 µl	25 µl	1×
DNA Template	1 µl	2 µl	as required
Forward Primer (10 µM)	0.5 µl	1 µl	0.2 µM each
Reverse Primer (10 µM)	0.5 µl	1 µl	0.2 µM each
ddH ₂ O to final volume	25 µl	50 µl	Not applicable

PCR 循环（二步法）

94°C 2-3 min

94°C 5-10 sec

60°C 30-34 sec



Dissociation Stage

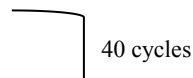
PCR 循环（三步法）

94°C 2-3 min

94°C 10-20 sec

55-60°C 10-20 sec

72°C 20-30 sec



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Tm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

A1: 无信号值出现

Q1:

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。

A2: CT 值出现过晚

Q2:

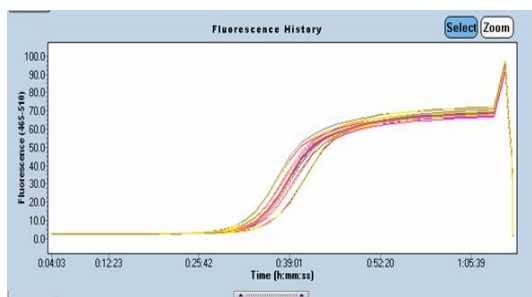
1. 扩增效率低，反应条件不够优化。设计更好的引物或探针；用三步法进行反应；适当降低退火温度；增加镁离子浓度等。
2. PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足。
3. PCR 产物太长。一般采用 100-150bp 的产物长度，一般不超过 500bp。

A3: 标准曲线的线性关系不佳

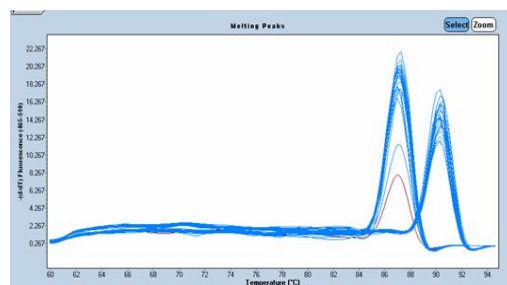
Q3:

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。

典型扩增曲线和融链曲线图（使用本制品在 Roche Light Cycler 480 II 三步法操作实际图片）



扩增曲线



融链曲线

ROX Reference Dye



北京艾德莱生物科技有限公司
Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

地址：北京市海淀区上地紫成创业园 C126--130

电话：010-82796972/82795296 (Fax)

网址：www.aidlab.cn www.aidlab.com.cn

使用说明书

包装量：

目录编号	包装单位
PC3801	25 μ l
PC3802	100 μ l

浓度：50 μ mol (100 \times)

储运温度：常温运输，-20 $^{\circ}$ C 长期保存，避免反复冻融。短期使用可放 4 $^{\circ}$ C

制品说明：ROX Reference Dye 一般用于 ABI、Stratagene 等公司的 Real Time PCR 扩增仪上，用于调整 PCR 加样误差所引起的 PCR 管与管之间的差异。不同仪器所需 ROX Reference Dye 浓度不同。Aidlab 提供 ROX Reference Dye 储存液，浓度为 50 μ mol (100 \times)，使用终浓度根据不同仪器为 500 nmol (1 \times , 高浓度) 或者 50 nmol (0.1 \times , 低浓度)，用户可以根据仪器的推荐浓度添加到荧光定量 PCR 反应体系内。

不同仪器 ROX 推荐使用终浓度(50 μ l 反应体系举例)：

Instrument	ROX (100 \times) Per 50 μ l PCR Reaction	Final Concentration
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT and 7900HT Fast, ABI Step One, ABI Step One Plus	0.5 μ l	1 \times
ABI 7500, 7500 Fast, Stratagene Mx3000P, Mx3005P, Mx4000, ABI QuantStudio Dx/3/5, ABI QuantStudio 6/7/12K Flex, ABI ViiA7	0.05 μ l *	0.1 \times
Roche LightCycler 480, Roche Light Cycler 96, MJ Research Chromo4, MJ Research Opticon 2, Takara TP-800, Bio-Rad iCycler iQ, Bio-Rad iCycler iQ5, Bio-Rad CF X96, Bio-Rad C1000 Thermal Cycler, Thermo Scientific Pikoreal 96, Qiagen Corbett Rotor-Gene 6000, Qiagen Corbett Rotor-Gene G, Qiagen Corbett Rotor-Gene Q, Qiagen Corbett Rotor-Gene 3000, Mastercycler ep realplex	NO need to use ROX	

从配制 PCR 反应的水溶液中减去 Rox 染料的体积。

* 为使每个反应精确加入小体积的 Rox (0.05 μ l)，推荐使用前将 ROX 用水稀释 10-20 倍后使用，这样可以精确吸量小体积溶液。

快捷用法（直接将 ROX 加入荧光定量 mix 中配成含 ROX 的荧光定量 mix 工作液使用）：

1. 需要**高浓度 ROX** (ROX 终浓度为 **1×**) 的机型（见上表）：使用前，按照 **1.25 ml 2 × Sybr Green qPCR mix** 加入 **25 μ l** ROX Reference Dye 的比例加入，充分混匀后，可以直接使用。
2. 需要**低浓度 ROX** (ROX 终浓度为 **0.1×**) 的机型（见上表）：使用前，按照 **1.25 ml 2 × Sybr Green qPCR mix** 加入 **2.5 μ l** ROX Reference Dye 的比例加入，充分混匀后，可以直接使用。