

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

XS22006

本产品仅供科学研究使用

试剂盒组成

组分	XS22006-125	XS22006-500
2 x SYBR Green qPCR Mix	1.25 mL	4 × 1.25 mL
ROX Reference Dye (100×)	25 μl	100 μl

保存方法及稳定性

-20 °C 避光保存至少 12 个月，使用前充分溶解混匀。
短期使用可放在 4 °C，避免反复冻融。

产品介绍

本产品是采用 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°C 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、本产品含独立包装参比染料 ROX，客户根据 qPCR 仪器技术指导决定是否需加 ROX 参比染料以及其加入浓度，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、本产品含 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产品。
- 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、本产品含有 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）

成分	体积 (25 μl)	体积 (50 μl)	最终浓度
2x SYBR Green qPCR Mix	12.5 μl	25 μl	1×
DNA 样本	1 μl	2 μl	根据实际需求
上游引物 (10 μM)	0.5 μl	1 μl	0.2 μM
下游引物 (10 μM)	0.5 μl	1 μl	0.2 μM
ddH ₂ O 补全至	25 μl	50 μl	

PCR 循环（二步法）

温度	时间	循环数
94°C	2-3 min	} 40
94°C	5-10 sec	
60°C	30-34 sec	
Dissociation Stage		

PCR 循环（三步法）

温度	时间	循环数
94°C	2-3 min	} 40
94°C	10-20 sec	
55-60°C	10-20 sec	
72°C	20-30 sec	
Dissociation Stage		

说明：本产品兼容性强，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。如果溶解曲线较差，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。

常见问题指南

A1: 无信号值出现

- 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 45 cycles），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

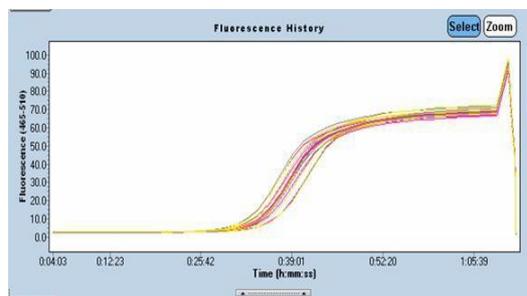
- 1) 扩增效率低，反应条件不够优化。设计更好的引物或探针；用三步法进行反应；适当降低退火温度；增加镁离子浓度等。
- 2) PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足。
- 3) PCR 产物太长。一般采用 100-150bp 的产物长度，一般不超过 500bp。

A3: 标准曲线的线性关系不佳

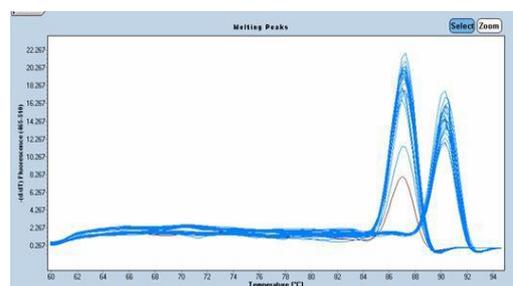
- 1) 加样存在误差，使得标准品不呈梯度。
- 2) 标准品出现降解。应避免标准品反复冻融，或重新制备并稀释标准品。
- 3) 引物或探针不佳。重新设计更好的引物和探针。
- 4) 模板中存在抑制物，或模板浓度过高。

典型扩增曲线和溶解曲线图

(使用本制品在 Roche Light Cycler 480 II 三步法操作实际图片)



扩增曲线



溶解曲线

附录：ROX Reference Dye (100×) 的使用说明

浓度：50 μmol (100×)

储运温度：-20° C 长期保存，避免反复冻融。短期使用可放 4° 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 μmol (100×)，使用终浓度根据不同仪器为 500 nmol (1×，高浓度) 或者 50 nmol (0.1×，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 μl 反应体系举例)，需从配制 PCR 反应的水溶液中减去 Rox 染料的体积：

Instrument	ROX (100×) Per 50 μl PCR Reaction	Final Concentration
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT and 7900HT Fast, ABI Step One, ABI Step One Plus	0.5 μl	1×
ABI 7500, 7500 Fast, Stratagene Mx3000P, Mx3005P, Mx4000, ABI QuantStudio Dx/3/5, ABI QuantStudio 6/7/12K Flex, ABI ViiA7	0.05 μl *	0.1×
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	不需要使用 ROX	

* 为使每个反应精确加入小体积的 Rox (0.05 μl)，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 μl 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 μl ROX Reference Dye 的比例加入，充分混匀后，可以直接使用。