



产品描述

ProQ™ qPCR SYBR Green Master Mix 是专为高特异性、高灵敏度实时定量 PCR 而设计。本产品基于热启动的 HotPro™ Taq DNA Polymerase，配合针对 qPCR 优化的最适 Buffer，可以有效抑制非特异扩增，从而显著提高扩增效率，适用于进行高灵敏度的 qPCR 反应。本产品中含有 qPCR 反应检测用的最适浓度 SYBR Green I，是一种 2×Premix Type 试剂，具有高灵敏度、高特异性、高稳定性等特点，使用方便。使用本产品进行 qPCR 反应，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。

产品应用

用于高特异性的荧光定量 PCR 实验。

产品组成

组份	PQ511-01 50rxn(50μ l/rxn)	PQ511-02 200 rxn(50μ l/rxn)
ProQ™ qPCR SYBR Green Master Mix	1.25 ml	1.25 ml×4

产品储存

-20℃避光储存。使用过程中请尽量避免反复冻融。如每次使用量较少，推荐小份分装使用。有效期一年。

注意事项

1. 本制品不含参比染料 ROX，客户并根据 qPCR 仪器技术指导决定是否要加 ROX 参比染料，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，配套 Rox Reference Dye (货号: PQ914) 可另行购买。
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。

使用说明

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 μ l)	Volume (50 μ l)	Final Concentration
ddH ₂ O to final volume	25 μl	50 μl	
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
ProQ™ qPCR SYBR Green Master Mix	12.5 μl	25 μl	1×

PCR 循环 (二步法) :

94°C	2-3 min	} 40 cycles
94°C	5-10 sec	
60°C	30-34 sec	
Dissociation Stage		

PCR 循环 (三步法) :

94°C	2-3 min	} 40 cycles
94°C	10-20 sec	
55-60°C	10-20 sec	
72°C	20-30 sec	
Dissociation Stage		

备注：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。

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 :

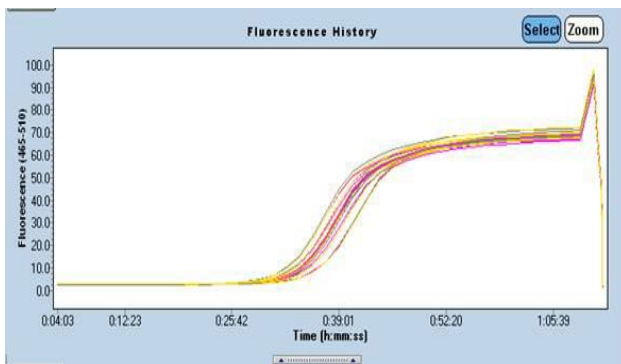
- (1) 扩增效率低, 反应条件不够优化。设计更好的引物或探针; 用三步法进行反应; 适当降低退火温度; 增加镁离子浓度等。
- (2) PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足。
- (3) PCR 产物太长。一般采用 100-150bp 的产物长度, 一般不超过 500bp。

Q3: 标准曲线的线性关系不佳

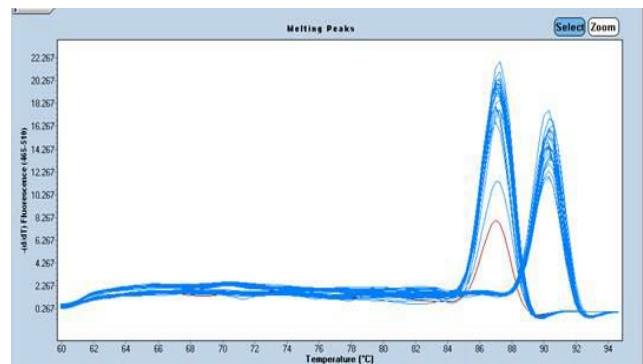
A3 :

- (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。

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