## 产品描述

ProQ™ qPCR EvaGreen Master Mix 是专为高特异性、高灵敏度实时定量 PCR 和高分辨率溶解曲线分析而设计的即用型试剂盒。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 EvaGreen，是一种新型的专为 qPCR 和高分辨率溶解曲线分析设计的 DNA 结合染料，它通过一种“按需求释放”的机制，极大地降低了对 PCR 扩增的抑制性。EvaGreen 染料不能透过细胞膜，因而不能与活细胞的基因组 DNA 结合，确保了其安全性。常规的 DNA 结合染料如 SYBR Green I，是一种众所周知的环境毒性比溴化乙锭（EB）还要大的诱变剂，存在潜在的致突变性。此外，EvaGreen 可以作为 DNA 预染的核酸染料，其 PCR 产物可以直接用于凝胶电泳检测，不需要额外添加任何核酸染料，电泳后可以直接用于观察 DNA 条带。本产品是一种 2×Premix Type 试剂，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 和高分辨率溶解曲线分析实验。

## 产品组成

| 组份 | PQ514-01 40rxn(50μ l/rxn) | PQ514-02 200rxn(50μ l/rxn) |
|---|---|---|
| ProQ™ qPCR EvaGreen Master Mix | 1 ml | 1 ml×5 |
| ROX Reference Dye (10×) | 500 μl | 500 μl×5 |

## 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. 本制品含参比染料 ROX，客户并根据 qPCR 仪器技术指导决定是否需要加 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。
2. 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。
3. 本制品含有 4 mM $MgCl_2$（反应体系终浓度是 2 mM Mg2+），可用 25mM $MgCl_2$ 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 |
|---|---|---|---|
| $ddH_2O$ 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 EvaGreen Master Mix | 10 μl | 20 μl | 1× |

PCR 循环（二步法）:

| | | |
|---|---|---|
| 94℃ | 2-3 min | |
| 94℃ | 5-10 sec | 40 cycles |
| 60℃ | 30-34 sec | |
| Dissociation Stage | | |

PCR 循环（三步法）:

| | | |
|---|---|---|
| 94℃ | 2-3 min | |
| 94℃ | 10-20 sec | 40 cycles |
| 55-60℃ | 10-20 sec | |
| 72℃ | 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 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℃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：

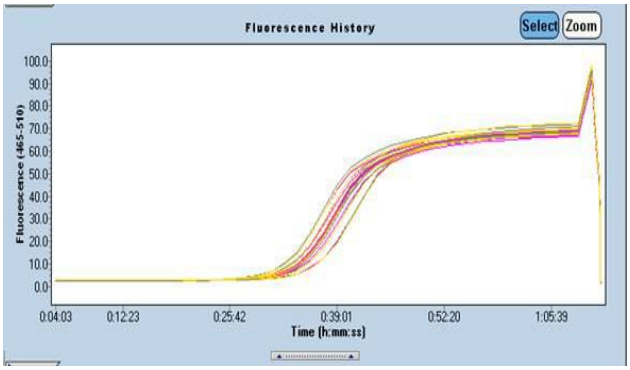
(1) 加样存在误差，使得标准品不呈梯度。

(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。

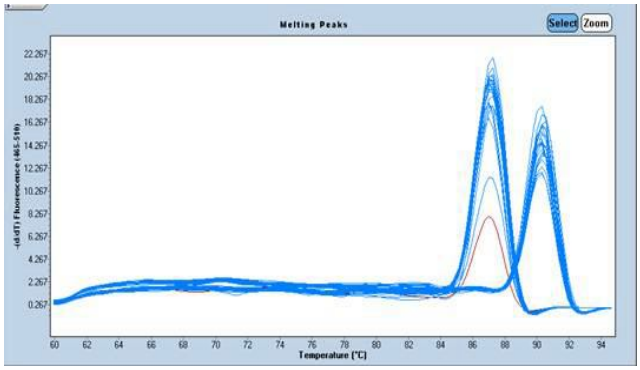
(3) 引物或探针不佳。重新设计更好的引物和探针。

(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