

2×Dual Sybr Green qPCR Mix(Universal 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

包 装 量：

目录编号	包装单位
PC6201	125次×20 µl
PC6202	500次×20 µl

Components	PC6201	PC6202
2×Dual SYBR qPCR Mix (Universal ROX PreMixed)	1.25 ml	1.25 ml×4

产品储存：-20℃ 避光保存至少 1 年。经常使用，解冻后可置于 4℃（3 个月内），避免多次冻融。

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 2×预混试剂。采用艾德莱特异的新型双封闭 HotStart Taq DNA Polymerase，配以特异的双阳离子缓冲液和多种特异性促进因子，增强特异性，减少引物二聚体的形成，使得结果更加准确可靠。本制品已加入特殊的通用 ROX 参比染料，适应于所有 qPCR 仪器，无需在不同的仪器上调整 ROX 的浓度，只需在配制反应体系时加入引物和模板即可进行扩增。

注意事项：

1. 本制品已加入特殊的通用ROX参比染料，具有高通用性，可用于各种仪器。无论是需要添加 ROX 的仪器（如 ABI 的各种需要高 ROX 或者低 ROX 机型），还是不需要添加 ROX 的仪器（如 Roche Light Cycler、Bio-Rad CFX96 等机型），均适用于本制品。
2. 使用前请轻柔上下颠倒以混匀 Master Mix，请勿 Vortex 避免产生过量气泡，影响定量结果。Master Mix 经混匀短暂离心后即可使用。
3. 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。
4. 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。

建议PCR条件(以 20, 50 µl 反应体系为例，反应液配制请在冰上进行)

Components	Volume (20 µl)	Volume (50 µl)	Final Concentration
2×Dual SYBR qPCR Mix	10 µl	25 µl	1×
DNA Template	1 µl	2 µl	as required
Forward Primer (10 µM)	0.4 µl	1 µl	0.2 µM each
Reverse Primer (10 µM)	0.4 µl	1 µl	0.2 µM each
ddH ₂ O to final volume	20 µl	50 µl	Not applicable

PCR 循环（二步法，首选默认程序）

95°C 2 min

95°C 15 sec

60°C 30–34 sec



40 cycles

Dissociation stage

PCR 循环（三步法）

95°C 2 min

95°C 15 sec

60°C 15–20 sec

72°C 20–30 sec



40 cycles

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（首选），三步法扩增效率高。如果融链曲线特异性较差，可以尝试提高两步法程序的退火温度（每次提高2-3°C）；若因使用T_m值较低的引物等原因，得不到良好的扩增结果时，可尝试延长两步法的延伸时间到60 sec或者进行三步法PCR扩增提高扩增效率。

荧光定量 PCR 实验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 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。

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 500 bp。

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。

Q4: 阴性对照也出现明显扩增

A4:

1. 反应体系或者水被污染：更换新的 Mix 或者水重复试验。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：一般在 35 循环以后阴性对照出现扩增属正常情况，可配合融解曲线进行分析。