

2×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

包 装 量：

目录编号	包装单位
PC5901	125次×20 µl
PC5902	500次×20 µl

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

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. 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经混匀短暂点甩离心后即可使用。
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×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。

ROX Reference Dye (100 ×)



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

包 装 量：	目录编号	包装单位
	PC3801	25 µl
	PC3802	100 µl

浓 度：(100×, 100 倍储存液)

储运温度：常温运输，-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 参比染料一般用于 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 100×)，使用终浓度根据不同仪器为 1×（高浓度 ROX）或者 0.1×（低浓 ROX），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)：

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	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 µl)，推荐使用前将 ROX (100×)储存液用 PCR 级水稀释 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(100 ×)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。

需要高浓度 ROX 机型反应体系举例（20μl 反应体系）：

ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT and 7900HT Fast, ABI Step One, ABI Step One Plus

Components	Volume	Final Concentration
cDNA	x μl	-
Forward primer(10μM)	0.4 μl	0.2 μM
Reverse primer(10μM)	0.4 μl	0.2 μM
ROX Reference Dye(100×)	0.2 μl [*]	1×
2×Sybr Green qPCR Mix	10 μl	1×
ddH ₂ O to final volume	20 μl	

* 为使每个反应精确加入小体积的 Rox (0.2 μl)，推荐使用前将 ROX (100×)储存液用 PCR 级水稀释 5 倍后使用，这样可以精确吸量小体积溶液。

需要低浓度 ROX 机型反应体系举例（20μl 反应体系）：

ABI 7500, 7500 Fast, Stratagene Mx3000P, Mx3005P, Mx4000, ABI QuantStudio Dx/3/5, ABI QuantStudio 6/7/12K Flex, ABI ViiA7

Components	Volume	Final Concentration
cDNA	x μl	-
Forward primer(10μM)	0.4 μl	0.2μM
Reverse primer(10μM)	0.4 μl	0.2μM
ROX Reference Dye(100×)	0.02 μl [*]	0.1×
2×Sybr Green qPCR Mix	10 μl	1×
ddH ₂ O to final volume	20 μl	

* 为使每个反应精确加入小体积的 Rox (0.02 μl)，推荐使用前将 ROX 用 PCR 级水稀释 50 倍后使用，这样可以精确吸量小体积溶液。