

2×qPCR SYBR Green Master Mix(Universal)

产品编号: MA2004 规格: 500μL / 5×1mL

产品内容

产品组成	MA2004-T	MA2004-1
2×qPCR SYBR Green Master Mix(Universal)	500μL	5×1mL
说明书	1份	1份

产品简介

2×qPCR SYBR Green Master Mix(Universal)是使用SYBR Green I嵌合荧光法进行实时定量 PCR (qPCR) 扩增的2×专用预混液。其核心组分是一种抗体修饰的新型热启动DNA聚合酶,可以有效抑制低温下的非特异性扩增,提高了反应特异性和扩增效率。同时配方中添加了针对qPCR优化的最适Buffer以及特异性促进因子,使定量 PCR 可以在宽的定量区域内获得良好的线性关系。此外,本产品中含有独特的校正染料,与一系列qPCR仪器兼容,实验过程中无需额外添加染料来校正仪器。本产品适用于DNA样本(基因组DNA、cDNA、质粒DNA、λDNA等)的扩增定量。

使用说明

(一) 反应体系: 按照下表配制反应体系,所有操作请在冰上进行:

组分	20μL体系 ^c	50μL体系 ^c
2×qPCR SYBR Green Master Mix(Universal)	10 μL	25 μL
上游引物(10μM) ^a	0.4 μL	1 μL
下游引物(10μM) ^a	0.4 μL	1 μL
模板DNA/cDNA ^b	适量	适量
ddH ₂ O	to 20 μL	to 50 μL

【注意】

- 引物终浓度推荐0.2μM,当反应性能较差时,可在终浓度0.2~1.0μM范围内调整引物浓度;
- 为保证扩增效率,建议将模板适当稀释后再进行qPCR反应。若模板为cDNA原液,则使用体积不超过qPCR反应总体积的1/10;
- 反应体系推荐使用 20μL或 50μL,以保证目的基因扩增的有效性和重复性。

(二) 反应程序

1. 两步法扩增程序:

步骤	温度	时间	循环数(cycles)
预变性	95 C	30 sec	1
变性	95 C	10 sec	40
退火/延伸 ^a	60 C	30 sec	
溶解曲线阶段 ^b			1



2.三步法扩增程序: 当模板浓度低或qPCR扩增效率低时可使用此程序

步骤	温度	时间	循环数(cycles)
预变性	95 C	30 sec	1
变性	95 C	10 sec	40
退火 ^a	55~65 C	10 sec	
延伸 ^a	72 C	30 sec	
熔解曲线阶段 ^b			1

【注意】

- a.根据引物的Tm值进行退火/延伸温度的设定; 若扩增片段在200bp以内, 退火/延伸时间可以设置为15sec; 此外, 退火/延伸时间的设置还需根据使用的qPCR仪所需要的最短数据采集时间自行调整;
- b.熔解曲线使用仪器默认程序即可。

(三) 结果分析

- 1.NTC (无模板阴性对照): 若NTC的Ct值 (循环阈值) > 35或无Ct, 则体系不存在污染; 若Ct值 < 35, 则体系可能存在污染或引物特异性差, 建议清洁实验环境、更换无菌水、检查引物是否污染, 或适当降低引物浓度、优化引物设计。
- 2.扩增曲线及Ct值: 标准扩增曲线呈光滑的“S”型。一般情况下目的基因Ct值在20~30之间, 内参Ct值在15~20之间。若Ct值较小, 建议将模板进行稀释; 若Ct值较大, 建议提高模板浓度或增大反应体系; 若Ct值 > 35, 检测结果无法定量分析基因的表达量, 但可用于定性分析。
- 3.熔解曲线: 标准熔解曲线呈单峰。若熔解曲线出现双峰或者多峰, 可能存在污染、引物二聚体或非特异扩增, 建议降低引物浓度或优化引物设计。

保存条件

-20°C避光保存, 自生产之日起12个月有效。

注意事项

- 1、qPCR引物设计建议: 引物长度推荐在25bp左右、Tm值60°C~65°C, GC含量控制在50%左右, 3'端最后一个碱基最好为G或C, 比对引物避免3'端或引物间有非特异性互补。
- 2、本产品解冻后可能会出现絮状或白色沉淀, 请室温下放置片刻并上下轻轻颠倒至溶液澄清, 不影响试剂性能。
- 3、本产品尽量避免反复冻融, 以免酶活下降; 可在首次解冻后分装保存。
- 4、本产品中含有荧光染料SYBR Green I, 需避光保存, 使用过程中尽量避免强光照射。
- 5、本产品在使用前需上下颠倒混匀; 使用过程中一定要避免产生气泡, 可短暂离心消除, 排除气泡对结果造成影响。
- 6、本产品检测灵敏度极高, 容易被环境中气溶胶污染, 因此配制反应体系时请在超净工作台内进行, 配制过程中推荐使用专用的移液枪和带滤芯的枪头; 配制体系前可以使用核酸清洗液 (美仑货号: MMT069) 对实验台面及操作环境进行清洁。
- 7、为不影响后续实验, 建议做预实验检查引物有效性和特异性。
- 8、本产品仅适用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。
- 9、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

常见问题与解答

问题	可能原因	建议
无Ct值出现	程序设置有误	需检查程序设置: 两步法扩增在退火延伸步骤采集信号, 三步法扩增在延伸阶段采集信号
	引物或模板降解	建议用PAGE电泳检测引物完整性, 琼脂糖凝胶电泳检测模板DNA或RNA的质量及完整性, RNA模板建议重新逆转录获得cDNA, 且尽快使用
	模板用量不足	适当增加模板用量或重新制备高浓度模板
实验重复性差	加样操作存在误差	建议使用性能较好的移液枪, 配制预混液后分装, 减少移液误差
	模板浓度低或拷贝数低	适当增加模板用量
	荧光定量PCR仪器不同位置温度控制不一致	定期校准仪器
扩增曲线形状异常	扩增曲线不光滑	信号太弱, 经系统校正后产生, 可提高模板浓度重复实验
	扩增曲线断裂、骤降	模板浓度较高导致基线的终点值大于Ct值, 可以减小基线终点(Ct值-4), 重新分析数据; 或反应管内留有气泡, 建议上机前离心并仔细检查反应管内是否有气泡残留

S250701

大连美仑生物技术有限公司

官网: <https://www.meilunbio.com/>

电话/邮箱: 0411-62910999 sales@meilun.com

本产品仅供科研使用

