

## 2\* SYBR Green qPCR Mix(LOW ROX)

货号: KM401-2

5ml

### 试剂盒储存:

在-20℃储存 12 个月不影响使用效果, 使用前充分融解混匀, 避免反复冻融。

### 产品介绍:

经过化学配体修饰的 Taq DNA Polymerase, 在室温下 (低于40℃) 活性被完全封闭, 可有效防止在样品准备及反应升温阶段产生非特异扩增和引物二聚体。经过 95℃加热后活性被释放, 与基于抗体的热启动 Taq 酶相比全新的配体修饰的 Hotmaster Taq DNA 聚合酶活性封闭更彻底, 严谨性更高。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。使用本品进行 qPCR 反应, 可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线, 对靶基因进行准确定量、检测, 重复性好, 可信度高。

### 注意事项:

1. 本制品已加入低浓度的 ROX 参比染料, 适用于 ABI 7500, 7500 Fast, Q6, ViiA™7, Quant Studio 6/7Flex; Stratagene MX4000, MX3005, MX3000; Corbett Rotor Gene 3000 以及其它需要低浓度 ROX 机型。
2. 本制品含 SYBR® Green I 强光下易分解, 使用时避免长时间强光照射本制品。
3. 在冰上配制 PCR 反应液, 可以提高扩增特异性, 减少背景。
4. 本制品含有 4 mM MgCl<sup>2</sup> (反应体系终浓度是 2 mM Mg<sup>2+</sup>), 可用 25mM MgCl<sup>2</sup> 优化 Mg<sup>2+</sup> 浓度。

### 操作步骤:

组分	体系	体系	终浓度
2 xSYBR qPCR Mix(LOW ROX)	12.5µl	25 µl	1×
DNA Template	1 µl	2 µl	
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
ddH <sub>2</sub> O to final volume	25 µl	50 µl	

1. 在qPCR管中配置如下混合液 (以25 $\mu$ l, 50  $\mu$ l反应体系为例, 反应液配制请在冰上进行)
2. PCR 反应扩增程序

扩增程序二步法				扩增程序三步法			
循环步骤	温度	时间	循环数	循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	2min	1	预变性	95°C	2min	1
变性	95°C	15sec	40	变性	95°C	15sec	40
退火/延伸	60°C	30-34sec		退火	60°C	15-20sec	
				延伸	72 °C	20-30sec	
溶解曲线阶段	仪器默认设置		1	溶解曲线阶段	仪器默认设		1

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, 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。

**结果分析：**定量实验至少需要三个生物学重复。反应结束后需要确认扩增曲线及溶解曲线。

1. 扩增曲线：标准扩增曲线为 S 型。Ct 值落在 20-30 之间时, 定量分析最准确; Ct 值小于 10, 需要将稀释模板后, 重新进行实验; Ct 值介于 30-35 之间时, 需要提高模板浓度, 或者增大反应体系的体积, 以提高扩增效率, 保证结果分析的准确性; Ct 值大于 35 时, 检测结果无法定量分析基因的表达量, 但可用于定性分析。
2. 溶解曲线：溶解曲线单峰, 表明反应特异性好可以进行定量结果分析; 若溶解曲线出现双峰或者多峰, 则不能进行定量分析。溶解曲线出现双峰, 需要通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳判断非目标峰是引物二聚体还是非特异性扩增。如果是引物二聚体, 建议降低引物浓度, 或者重新设计扩增效率高的引物。如果是非特异性扩增, 请提高退火温度, 或者重新设计更高特异性的引物。