



# Green qPCR MasterMix (High ROX)

## 产品信息:

组成	MT511-01	MT511-02	MT511-03
2×Green qPCR MasterMix	1ml	1ml×5	1ml×15
10×High ROX dye	200μl	200μl×5	200μl×15
H <sub>2</sub> O(RNase free)	1ml	1ml×5	1ml×15

**存储条件:** -20℃避光保存。如需频繁使用，可存放于 2-8℃，避免反复冻融。

## 制品说明:

Green qPCR MasterMix (High ROX) 是专用于染料法 (SYBR Green I) 实时荧光定量PCR的预混体系，浓度为2×，包含HotStar Taq DNA Polymerase、PCR Buffer、dNTPs、SYBR Green I荧光染料和Mg<sup>2+</sup>和一根High ROX校正染料，操作简单方便。主要用于基因组DNA靶序列和RNA反转录后cDNA靶序列的检测。

本品所含的荧光染料SYBR Green I可以与所有的双链DNA结合，使该产品可用于不同靶序列的检测而不需合成特异性标记探针。本品含有的HotStar Taq DNA Polymerase是一种经抗体修饰的、全新高效热启动酶，在常温下没有聚合酶活性，有效避免在常温条件下由引物和模板非特异性结合或引物二聚体而产生的非特异性扩增，酶的激活只需在95℃下孵育2分钟。独特的PCR缓冲体系与热启动酶的组合，有效抑制了非特异性的PCR扩增，显著提高了PCR的扩增效率。

所含的ROX染料可校正定量PCR仪孔与孔之间产生的荧光信号误差，本试剂盒中ROX校正染料含量较高，适用于ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABIStep One/Step One Plus等需要较高ROX信号进行校正的荧光定量PCR仪。

## 产品特点:

1. 本产品中使用了全新高效热启动酶HotStar Taq DNA Polymerase与独特的PCR缓冲体系，显著提高PCR的扩增效率，具有高灵敏度和特异性强的特点；
2. 适用于荧光定量PCR检测，能够准确地对目的基因进行定量和检测。

## 注意事项:

1. 使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用；
2. 本产品中含有SYBR Green I荧光染料和ROX染料，保存本产品或配制PCR反应液时应避免强光照射；
3. 避免反复冻融本品，反复冻融可能使产品性能下降。
4. 本品不能用于探针法荧光定量PCR。
5. 配制反应液时，请使用新的或者无污染的枪头和离心管，尽量防止污染。

## 操作步骤:

以下举例为常规PCR 反应体系和反应条件，实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

### 1. PCR反应体系:

试剂	20μl反应体系	终浓度
2×Green qPCR MasterMix	10μl	1×
10×High ROX dye	2μl	
Forward Primer, 10μM	0.4μl	0.2μM
Reverse Primer, 10μM	0.4μl	0.2μM
Template DNA	2μl	
H <sub>2</sub> O(RNase free)	Up to 20μl	

## 注意:

- 1) 通常引物浓度以0.2μM可以得到较好结果，可以终浓度0.1-1.0μM作为设定范围的参考。
  - 2) 通常DNA模板的量以10-100ng基因组DNA或1-10ng cDNA为参照，因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。
  - 3) 推荐反应体系为20μl，也可以根据实际实验需求按比例扩大或者缩小反应体系。
2. PCR反应程序:

**注意！本产品预变性反应只需在95℃、2min下完成！**

建议采用下表显示的两步法PCR进行程序设定，本程序是以ABI7900荧光定量PCR仪为例。若因Tm值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法PCR扩增，三步法操作步骤详见《反应条件的优化》。

步骤	温度	时间	
预变性	95℃	2min	} 40-50个循环
变性	95℃	15s	
退火/延伸	60℃	30s	
融解曲线分析			
	95℃	15s	
	60℃	1min	
	95℃	15s	
	60℃	15s	

**注意：**

- 1) 本产品所采用的热启动酶只需在预变性95℃、2min条件下实现酶的活化。
- 2) 退火温度请以60-64℃作为设定范围的参考，发生非特异性反应时，可提高退火温度。
- 3) 本说明是以ABI 7900荧光定量PCR仪为参照设定，融解曲线分析请以所使用的荧光定量PCR仪推荐的程序进行设定。

**反应条件的优化**

在荧光定量反应条件优化时，应从引物浓度、退火温度、延伸时间等方面进行考虑，以提高反应特异性和扩增效率。

1. 反应特异性和扩增效率高的实验体系应具备以下条件：

- 1) 反应特异性高：阴性对照无引物二聚体等非特异性扩增；不产生目的片段以外的扩增。
- 2) 扩增效率高：Ct值低；PCR扩增效率高，接近理论值100%。

2. 反应条件优化方法：

- 1) 引物浓度：通常引物浓度以0.2μM可得到较好结果，可以终浓度0.1-1.0μM作为设定范围的参考。若提高反应特异性，可降低引物浓度；若提高扩增效率，可增加引物的浓度，由此优化反应体系。
- 2) 退火温度：建议采用两步法PCR，退火温度60℃进行反应。若提高反应特异性，可提高退火温度，以60-64℃作为设定范围的参考。

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，可尝试进行三步法PCR扩增，三步法的退火温度请以56℃-64℃的范围作为设定参考。

- 3) 延伸时间：建议采用两步法PCR，延伸时间1 min进行反应。若提高扩增效率，可尝试将延伸时间增加，或尝试三步法PCR。

**注意！本产品预变性反应只需在95℃、2min下完成！**

三步法荧光定量PCR（本程序是以ABI7500荧光定量PCR仪为例）：

步骤	温度	时间	
预变性	95℃	2min	} 40-50个循环
变性	95℃	15s	
退火	60℃	15s	
延伸	72℃	30s	
融解曲线分析			
	95℃	15s	
	60℃	1min	
	95℃	15s	
	60℃	15s	

**注意：**

- 1) 本产品所采用的热启动酶只需在预变性95℃、2 min条件下实现酶的活化。
- 2) 无法得到理想的扩增效率时，适当降低退火温度；发生非特异性反应时，提高退火温度，由此优化反应条件。
- 3) 若需提高反应扩增效率，可适当增加延伸时间。
- 4) 本说明是以ABI 7900荧光定量PCR仪为参照设定，融解曲线分析请以所使用的荧光定量PCR仪推荐的程序进行设定。