



Green qPCR MasterMix (High ROX)

产品信息:

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

存储条件

-20℃避光保存。频繁使用时，可存放于 2-8℃，避免反复冻融。

产品说明

Green qPCR MasterMix (High ROX) 是基于SYBR Green I嵌合荧光法的2×预混试剂，专为实时定量PCR (qPCR) 设计。预混试剂包含优化的PCR缓冲体系及HotStart Taq DNA聚合酶，同时添加了SYBR Green I荧光染料。SYBR Green I可特异性结合所有双链DNA产物，无需合成标记探针，即可实现多种靶序列的实时定量检测。抗体封闭的HotStart Taq DNA聚合酶在常温下无活性，有效抑制引物与模板非特异性结合及引物二聚体形成，显著降低非靶标扩增风险。该产品适用于需要高ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪，适配机型包括ABI Prism7000/7300/7700/7900/StepOne/StepOnePlus等。

产品特点

- 1.使用了全新高效HotStart Taq DNA聚合酶与独特的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.本产品广泛适用于动物、植物以及微生物等DNA的实时荧光定量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.使用前请颠倒轻轻混匀，避免起泡，短暂离心后使用。
- 2.本产品中含有SYBR Green I荧光染料，保存本产品或配制PCR反应液时应避免强光照射。
- 3.本品不能用于探针法荧光定量PCR。
- 4.配制反应液时，请使用新的吸头和离心管，防止污染。

操作步骤:

1.在合适的定量PCR管中配制如下混合液

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

反应体系中引物和模板量可根据以下原则自行调整。

- 1) 通常引物终浓度为0.2 μM即可得到较好的扩增效果。当实验结果比较差时，可在终浓度0.1-1.0 μM范围内调整引物浓度。
- 2) 通常DNA模板的量以10-100 ng基因组DNA或1-10 ng 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。当模板类型为未稀释cDNA原液时，使用体积均不应超过反应总体积的1/10，即2 μL/20 μL反应体系。
- 3) 推荐20 μL标准反应体系。可根据实验需求，等比例放大或缩小反应体积（如30 μL或10 μL）。

2. PCR反应程序

两步法PCR程序

步骤	循环次数	温度	时间
预变性	1	95℃	2 min
变性/退火/延伸	40-45	95℃	15 s
		60℃	30 s 信号采集
熔解曲线分析	1	使用仪器默认熔解曲线采集程序	

三步法PCR程序

步骤	循环次数	温度	时间
预变性	1	95℃	2 min
变性/退火/延伸	40-45	95℃	15 s
		60℃	15 s
		72℃	30 s 信号采集
熔解曲线分析	1	使用仪器默认熔解曲线采集程序	

注意：

- 1) 本产品采用了热启动Taq DNA聚合酶，需要95℃预变性2 min实现Taq酶的活化。
- 2) 绝大多数定量PCR采用两步法程序，设置的退火和延伸温度为60℃。出现非特异性反应时，可提高温度，以60-64℃为设定范围。实验结果不好时，可尝试三步法PCR扩增程序。

常见问题与解决方案

1. 扩增曲线形状异常

- ① 扩增曲线不光滑：信号太弱（系统矫正后产生）或ROX染料与仪器不匹配，检查ROX染料类型。提高模板浓度后重复实验。
- ② 扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于CT值。减小基线终点(CT值- 4)，重新分析数据。
- ③ 个别扩增曲线突然骤降：反应管内存在气泡。加样时轻柔操作，充分离心去除气泡。扩增前检查反应管内液体是否存在气泡，离心不能去除气泡时可用加热的注射器针尖消除气泡。

2. 无扩增曲线出现

- ① 反应循环数不够：将扩增循环数设为40-45，但是需避免过多循环导致背景信号干扰，降低数据可信度。
- ② 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法程序，信号采集设置在退火延伸阶段（通常是60℃）。三步法程序，信号采集设置在72℃延伸阶段。
- ③ 确认引物是否降解：检测引物完整性，可以引物应先通过PAGE电泳检测完整性，或使用新合成的引物。
- ④ 模板浓度太低：提高模板浓度（从最高浓度开始稀释），或重新制备模板。一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- ⑤ 模板降解：重新制备模板，重复实验。

3. CT值出现过晚

- ① 扩增效率极低：优化反应条件（如改用三步法扩增程序），或重新设计合成引物。
- ② 模板问题：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。模板降解，需要重新制备模板，重复实验。
- ③ PCR产物太长：推荐PCR产物长度为80-150 bp。
- ④ 存在PCR抑制剂：稀释或重新制备模板以去除PCR抑制剂。

4. 阴性对照出现明显扩增

- ① 反应体系污染：更换新的Mix、ddH₂O和引物，并在超净工作台内配制反应体系。
- ② 引物二聚体的出现：通过熔解曲线分析排除引物二聚体干扰。

5. 熔解曲线出现多峰

- ① 引物设计不优：重新设计引物（遵循设计原则优化特异性）。
- ② 引物浓度太高：适当降低引物浓度。
- ③ cDNA模板有基因组DNA污染：重新制备RNA，去掉基因组DNA，然后逆转录制备cDNA模板，避免基因组污染。

6. 实验重复性差

- ① 加样操作失准：使用性能较好的移液器；提高加样精度，定期校准移液器。
- ② 定量PCR仪温控问题：定期校准定量PCR仪的温度模块。
- ③ 模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，降低模板稀释度或提高加样体积。