



蓝色 Green qPCR MasterMix (通用型)

产品信息:

组成	MT522 -01	MT522 -02
2×蓝色 Green qPCR MasterMix	1 ml	1 ml×5
50× Universal ROX	40 μl	40 μl×5
黄色样本稀释液 (10×)	1 ml	1 ml
H ₂ O (RNase free)	1 ml	1 ml×5

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

蓝色Green qPCR MasterMix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荧光染料与蓝色分样指示剂。配套的黄色样本稀释液与主试剂混合后，通过**蓝黄变绿**的显色效应可直观追踪移液过程，有效避免加样错误。经实验验证，两种颜色指示剂均不会干扰荧光信号检测，确保实验数据准确可靠。

本品所含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。该产品适用于所有荧光定量PCR仪。

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。
- 3.本产品含有50× Universal ROX，满足所有仪器需要。

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。
- 5.黄色模板稀释液使用时应按1:10比例稀释至**终浓度为1×**（即每1 μL原始模板如cDNA加入8 μL水和1 μL 10×黄色稀释液）。稀释后的黄色模板添加量控制在2-5 μL/20 μL反应体系内。使用透明PCR管/板时，建议置于白色背景上操作，可增强颜色对比度，便于观察移液效果。如不需要进行移液追踪，可以不使用黄色模板稀释液。

操作步骤:

1. (1) 以下配制体系适用于Roche LightCycler 480, Roche LightCycler 96, Bio-rad iCycler iQ, iQ5, CFX96等无需ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪。

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

(2) 以下配制体系适用于 ABI Prism7500/7500 Fast, Stratagene Mx3000/Mx3005P, Corbett Rotor Gene 3000, ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABIStep One/Step One Plus 等需要ROX信号校正的荧光定量PCR仪。

试剂	20 μ L反应体系	终浓度
2 $\times$ 蓝色 Green qPCR MasterMix	10 μ L	1 $\times$
50 $\times$ Universal ROX	0.4 μ L	1 $\times$
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ L	0.2 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ L	0.2 μ M
Template DNA	2 μ L	
H ₂ O (RNase free)	Up to 20 μ L	

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 μ M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 μ M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 μ L/20 μ L反应体系。
- 3) 推荐20 μ L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 μ L或10 μ L)。

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 $^{\circ}$ C	2 min
变性/退火/延伸	40-45	95 $^{\circ}$ C	15 s
		60 $^{\circ}$ C	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 $^{\circ}$ C	2 min
变性/退火/延伸	40-45	95 $^{\circ}$ C	15 s
		60 $^{\circ}$ C	15 s
		72 $^{\circ}$ C	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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C。出现非特异性反应时, 可提高温度, 以60-64 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C)。三步法程序, 信号采集设置在72 $^{\circ}$ C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。
- ③PCR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。
- ③cDNA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。

20250430