



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel:400-699-0631

[http:// www.real-tims.com.cn](http://www.real-tims.com.cn)

E-mail: real-times@vip.163.com

2×SYBR qPCR MasterMix (Universal)

Ver. 710854

● 产品包装：

组成	RTQ3101-02 (可做 40 次 50 μ l 反应)	RTQ3101-03 (可做 200 次 50 μ l 反应)	RTQ3101-04 (可做 1000 次 50 μ l 反应)	长期贮存
2×SYBR qPCR MasterMix	1ml	5×1ml	25×1ml	-20℃
RNase-free water	1 ml	5×1 ml	25×1 ml	-20℃

注：以 50 μ l qPCR 反应体系为例，每次使用 25 μ l 2× MasterMix，1 ml 可做 40 次 50 μ l qPCR 反应。

● 储存条件：-20℃ 避光保存；经常使用时，一旦融化后请 4℃ 贮存，4℃ 保存至少 3 个月；尽量避免反复冻融。

● 产品简介：

本制品是采用 SYBR[®] Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。已经将 Hot-Start DNA 聚合酶、dNTP、特殊稳定剂、优化的反应缓冲液和 SYBR[®] Green I 等试剂预混成一种适合 Real Time PCR 反应检测用 2×MasterMix 试剂，具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。

本制品使用新型抗体修饰的 HotStart Taq DNA 聚合酶，并结合精心优化的反应 Buffer，从而有效抑制低温下的非特异性扩增，提高反应特异性和扩增效率，能够在更广泛的范围内进行准确定量。使用时只需加入模板、引物和水，便可在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对目的基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。

预混液中含有优化的校正染料，与一系列 qPCR 设备兼容，包括需要 ROX 校正的仪器，实验操作过程中不需要额外添加校准染料来校正仪器。

● 注意事项

1. 本制品中已经含有优化的校正染料，客户无需再添加校正染料，可以直接使用。
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. 建议在冰上配制 qPCR 反应液，再放入 qPCR 仪器中扩增。可以提高扩增特异性，减少背景。
4. -20℃ 下保存时间较长，有微量沉淀产生，充分混匀后不影响使用。本制品已经优化了反应缓冲液中的 Mg²⁺ 浓度，无需再调节 Mg²⁺ 浓度。
5. 模板 DNA：用本产品，cDNA、基因组 DNA、质粒 DNA、病毒 DNA 等都可作为模板。在添加 DNA 模板时请注意模板量对 PCR 扩增的影响。本产品建议添加量为：cDNA 添加量不应超过总反应体系的 10%；基因组 DNA 为模板时，为避免在高浓度区域出现线性差的情况，请注意添加量小于 500 ng；病毒 DNA 也可作为 PCR 模板，添加时请以 300 ng 为上限；由于质粒 DNA 浓度和拷贝数很高，在添加 PCR 模板之前最好进行稀释梯度试验，以便确定合适的质粒 DNA 拷贝数。

6. 引物：

建议每条引物工作浓度 200 nM-800 nM；为得到高灵敏度定量性的数据，引物的设计非常重要。以下列举了设计引物时需注意的一般事项。

- a) 引物长度请设定为 18bp~30bp、GC 含量为 40%~65%；
- b) 扩增片段一般小于 300bp，请尽量设定在 80bp~150bp。过长的片段容易导致扩增效率降低；
- c) 如设计 mRNA 为目的片段的引物，设计应尽量横跨内含子，以防止基因组 DNA 的扩增而引起假

阳性;

- d) 请尽量选择 Tm 为 65°C~67°C;
- e) A、G、C、T 整体分布尽量均匀。不要有部分的 GC rich 或 AT rich (特别是 3'端)。避开 T/C (Polypyrimidine) 或 A/G (Polypurine) 的连续结构;
- f) 避开引物内部或两条引物之间有 3 个碱基以上的互补序列。二条引物间的 3'末端避开有 2 个碱基以上的互补序列;
- g) 引物设计完成后要使用 BLAST 检索确认引物的特异性。

此外, 引物的纯化纯度对反应特异性有很大的影响。经过一般纯化、纯度较低的引物荧光强度散乱, 容易产生非特异性产物, 致使熔解曲线出现杂峰。请尽可能使用 HPLC 级别纯化, 至少要用经 Cartridge(OPC)级别以上纯化的引物。

7. 对照设计:

- 1) No template control (NTC): 在 qPCR 反应体系中仅仅缺少模板。用以检测有无二聚体和试剂有无污染。
- 2) Reverse Transcriptase control: 用以评估逆转录反应中是否有基因组 DNA 的污染。在逆转录反应中仅仅不含有逆转录酶。

● 使用说明:

- 1. 冰浴中彻底融化 2×qMasterMix, 避免涡旋震荡, 以免产生过多气泡, 彻底混匀后快甩离心将溶液收集到管底。
- 2. 按照下表在制备反应体系:

	50 μl 反应体系	20 μl 反应体系	终浓度
2×qPCR MasterMix	25 μl	10 μl	1×
上游引物 10 μM	1 μl	0.4 μl	0.2 μM
下游引物 10 μM	1 μl	0.4 μl	0.2 μM
模板	x μl	x μl	10pg-100ng
水	补至 50 μl	补至 20 μl	

- 3. 快甩离心将反应液收集到管底。
- 4. 检测片段大于 300 bp, qPCR 仪上推荐执行以下程序 (三步法):

步骤	温度	时间	循环数
初始变性	95°C	30 sec*	1
变性	95°C	15 sec	40
退火	55-65°C	30 sec	
延伸	72°C	30 sec	
熔解曲线	使用机器默认采集程序		

检测片段小于 300 bp, qPCR 仪上推荐执行以下程序 (两步法):

步骤	温度	时间	循环数
初始变性	95°C	30 sec*	1
变性	95°C	15 sec	40
退火和延伸	60°C	60 sec	
熔解曲线	使用机器默认采集程序		

注: 由于本 MasterMix 中的 Hot-start DNA 聚合酶是经过抗体修饰的, 初始变性 95°C 30 sec 即可。

● 实验结果分析

注: 本制品仅供科研用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂等用途。
中科瑞泰(北京)生物科技有限公司 电话:400-699-0631 E-mail:real-times@vip.163.com http://www.real-times.com.cn

反应结束后加做融解曲线，以区分扩增产物及引物二聚体。根据扩增曲线和融解曲线结果可进行 PCR 定量标准曲线的制作。

● 常见问题及处理

问题	可能原因	推荐的解决方法
无扩增曲线且无扩增产物（凝胶电泳）	反应体系中有 PCR 反应抑制剂	更换或纯化模板 DNA。
	引物设计不合理	重新设计、合成引物。
	逆转录产物体积过量	减少逆转录产物量以不超过反应体系的 10%。
	加样错误或有试剂未加	检查是否加了所有的所需试剂。
	引物的降解	通过 PAGE 电泳检测引物完整性。
	退火温度不正确	优化退火温度。
无扩增曲线但有扩增产物（凝胶电泳）	qPCR 仪设置不正确	检查 dye selection, reference dye 是否选择正确
	失效的荧光检测	荧光检测应在 PCR 循环的退火/延伸阶段。
	荧光 PCR 仪问题	参考 qPCR 仪器说明书
阴性对照（NTC）有扩增曲线	反应体系中有污染	qPCR 片段较小，极易造成环境中气溶胶污染。如果融解曲线分析，解链温度和目的片段相同，凝胶电泳中 NTC 中的片段大小和目的片段相同，极有可能是反应体系中某一或某些试剂污染所引起的。建议换至没有污染源的环境进行 PCR 体系的配制。
	引物二聚体	进行溶解曲线分析，如果扩增曲线的解链温度小于 80℃，凝胶电泳片段大小和目的片段不符。请重新设计引物。 提高退火温度 3℃。
PCR 效率高于 110% (斜率>-3.1)	有非特异性扩增	溶解曲线分析非特异性扩增；优化引物设计
PCR 扩增效率低于 90% (斜率<-3.6)	反应体系中有 PCR 反应抑制剂	更换或纯化模板 DNA
	PCR 扩增条件不合适引起扩增效率降低。	确认引物浓度。注意 qPCR Master Mix 是否失效。
	引物设计	重新设计引物，避免扩增区域的 DNA 二级结构。
实时荧光曲线线性不好	模板 DNA 含量较低或过高	应调整样品的 DNA 浓度。
	模板 DNA 中含有抑制 PCR 扩增反应的物质	对模板 DNA 进行纯化或更换模板。
	质量不好的逆转录试剂盒合成的 cDNA，逆转录反应液中所含的物质可能抑制 PCR 反应。	请降低样品浓度，或将样品纯化后再进行反应。建议使用品牌质量较好的 cDNA 合成逆转录试剂盒。
CT 值高于预期值	加入的模板量太少	适当增加模板量。
	样品被降解	检查样品的完整性。
	引物不合适	重新设计合成引物。

CT 值低于预期值	加入了过多的模板	减少模板量。
	PCR 产物太长	一般采用 100-150bp 的产物长度，一般不超过 500bp
CT 值的标准差>0.16	取样不准确	每种样品的反应混合液单独配制，充分混匀；qPCR 之前要离心，管壁不要沾有反应液。
ΔRn 值太小	PCR 效率太低	优化 PCR 反应条件。
	目标模板数太低	增加模板量。
扩增曲线的荧光信号弱，或扩增曲线呈锯齿状	PCR 的延伸时间过短即荧光读取时间不充分，荧光收集不能充分完成。	适当增加延伸时间。
	以少于 PCR 仪器标准条件的反应体积进行扩增，荧光收集量的误差会增大	应增加反应体积以满足 PCR 仪器标准。