

AceQ® qPCR SYBR Green Master Mix (Low ROX Premixed)

Q131

Version 22.1



产品概述

本产品是使用SYBR Green I嵌合荧光法进行qPCR的专用试剂。核心组分AceTaq DNA Polymerase是基于化学法修饰的热启动DNA聚合酶，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。本产品是一种含有qPCR反应最适浓度SYBR Green I的2 × 预混试剂，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。

产品组分

组 分	Q131-02 (500 rxns/20 µl reaction)	Q131-03 (2,500 rxns/20 µl reaction)
2 × AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Low ROX Premixed)*	4 × 1.25 ml	5 × Q131-02

* 包含dNTP, Mg²⁺, AceTaq DNA Polymerase, SYBR Green I, ROX Reference Dye 2等。

保存条件

-30 ~ -15°C避光保存, ≤0°C运输。

适用范围

本试剂用于DNA样本的扩增定量，可以扩增所有物种来源的DNA，样本类型可以是基因组DNA、cDNA、质粒DNA、λDNA等。

适用机型

本产品中预混了用以校正孔与孔之间荧光信号误差的ROX Reference Dye 2 (低浓度)，适用于以下荧光定量PCR仪：

Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA7;

Stratagene MX4000, MX3005P, MX3000P;

以及其他需要添加低浓度ROX Reference Dye的荧光定量PCR仪。

注意事项

1. 本品尽量避免反复冻融，以免酶活下降。如每次使用量较少，推荐小份分装使用。
2. 使用前请上下颠倒以混匀Mix，请勿vortex以免产生过多气泡引起反应体系体积失准，进而影响定量结果。Mix经混匀轻微离心后即可使用。使用过程中吹打要轻，如果操作不慎Mix起泡，需再次离心方可使用。
3. 由于本品中含有荧光染料SYBR Green I，因此无论保存Mix还是配制反应体系时都应该尽量避免强光照射。
4. 由于本品检测灵敏度极高，即使空气中微量的DNA气溶胶都可以引起污染，进而导致实验失败。因此反应体系配制时请于超净工作台内进行，配制过程中请使用干净灭菌枪头、反应管，条件容许的实验室推荐使用专用的移液枪，避免污染。推荐使用带滤芯的枪头。

实验流程(以ABI 7500为测试机型)

1. 在qPCR管中配制如下混合液

2 × AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Low ROX Premixed)	10.0 µl
Primer 1 (10 µM)	0.4 µl
Primer 2 (10 µM)	0.4 µl
Template DNA/cDNA	x µl
ddH ₂ O	To 20.0 µl

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

- ▲ 一般来说反应体系中引物终浓度为0.2 µM即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度0.1 - 1.0 µM范围内调整引物浓度。
- ▲ qPCR灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。
- ▲ 如模板类型为未稀释cDNA原液，使用体积不应超过qPCR反应总体积的1/10。

2. 按下列条件进行qPCR反应

Stage 1	预变性 ^a	Rep: 1	95°C	5 min
Stage 2	循环反应 ^b	Reps: 40	95°C	10 sec
			60°C	30 sec
Stage 3	熔解曲线 ^c	Rep: 1	95°C	15 sec
			60°C	60 sec
			95°C	15 sec

- a. AceTaq DNA Polymerase需要热激活处理以恢复酶活，请至少设置PCR反应预变性条件为95°C 5 min。如果模板的GC含量较高，可将预变性时间延长至10 min。
b. 延伸时间请根据您使用的Real-time PCR仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用ABI 7700和7900HT时至少30 sec；使用ABI 7000和7300时至少31 sec；使用ABI 7500时至少34 sec；使用ABI StepOnePlus时至少10 sec。
c. 仪器类型不同，熔解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。

常见问题与解决方案

◇ 扩增曲线形状异常

- ① 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统矫正后产生。提高模板浓度重复实验。
- ② 扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于 C_T 值。减小基线终点(C_T 值-4)，重新分析数据。
- ③ 个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡。处理样本时要注意离心，进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

◇ 反应结束无扩增曲线出现

- ① 反应循环数不够：一般设置循环数为40，但需要注意的是过多的循环会增加过多的背景信号，降低数据可信度。
- ② 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段；三步法扩增程序应当将信号采集设置在72°C延伸阶段。
- ③ 确认引物是否降解：长时间未用的引物应先通过PAGE电泳检测完整性，以排除其降解的可能。
- ④ 模板浓度太低：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。
- ⑤ 模板降解：重新制备模板，重复实验。

◇ C_T 值出现太晚

- ① 扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计合成引物。
- ② 模板浓度太低：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。
- ③ 模板降解：重新制备模板，重复实验。
- ④ PCR产物太长：推荐PCR产物长度为80 - 150 bp。
- ⑤ 体系中存在PCR抑制剂：一般为模板带入，加大模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验。

◇ 阴性对照出现明显扩增

- ① 反应体系污染：更换新的Mix、ddH₂O、引物重复实验。反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染。
- ② 引物二聚体的出现：配合熔解曲线进行分析。

◇ 绝对定量时标准曲线线性关系不佳

- ① 加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积。
- ② 标准品降解：重新制备标准品，重复实验。
- ③ 模板浓度太高：提高模板稀释倍数。

◇ 熔解曲线出现多峰

- ① 引物设计不优：根据设计原则设计合成新的引物。
- ② 引物浓度太高：适当降低引物浓度。
- ③ cDNA模板带有基因组污染：重新制备cDNA模板。

◇ 实验重复性差

- ① 加样体积失准：使用性能较好的移液枪；将模板做高倍稀释，以大体积加入反应体系中。
- ② 定量PCR仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。
- ③ 模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，减少模板稀释度或提高加样体积。

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。