ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Without ROX)

Q321

Version 22.1

产品概述

本产品是使用SYBR Green I嵌合荧光法进行qPCR反应的专用预混液。核心组分Champagne Taq DNA Polymerase为一种新型的抗体法热启动DNA聚合酶，具有特异性强、检测灵敏度高等诸多优点，配以针对qPCR优化的最适Buffer以及特异性促进因子，非常适合于进行高特异性、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，对靶基因定量准确、重复性好、可信度高。

产品组分

组 分	Q321-02 (500 rxns/20 μl reaction)	Q321-03 (2,500 rxns/20 μl reaction)
2 × ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Without ROX)*	4 × 1.25 ml	5 × Q321-02

* 包含dNTP，Mg^{2+}，Champagne Taq DNA Polymerase，SYBR Green I等。

保存条件

-30 ~ -15℃避光保存，≤0℃运输。Master Mix解冻后可于2 ~ 8℃避光条件下稳定存放6个月。

▲ Master Mix解冻后可能出现些许白色沉淀，室温放置片刻并上下颠倒，沉淀即会溶解。请确认沉淀完全溶解，并充分混匀后使用。

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

本产品中不包含用以校正孔与孔之间荧光信号误差的ROX Reference Dye，适用于以下荧光定量PCR仪：

Bio-Rad CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ5, MyiQ; MiniOpticon, Opticon, Opticon 2, Chromo4; Cepheid SmartCycler;
Eppendorf Mastercycler ep realplex, realplex 2 s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000;
Roche Applied Science LightCycler 480; Thermo Scientific PikoReal Cycler; 及其他不需要添加ROX Reference Dye的荧光定量PCR仪。

注意事项

1. 若发现Master Mix解冻后有些许白色沉淀，请室温下放置片刻并上下颠倒，沉淀溶解后使用。
2. 本品尽量避免反复冻融，以免造成酶活下降。如每次使用量较少，推荐小份分装使用。
3. 使用前请上下颠倒以混匀Master Mix，请勿vortex避免产生气泡，影响定量结果。Master Mix经混匀短暂离心后即可使用。加样过程中吹打要轻，如果操作不慎Master Mix起泡，需再次离心方可使用。
4. 由于本品中含有荧光染料SYBR Green I，因此需避光保存，配制反应体系时应尽量避免强光照射。
5. 由于本品检测灵敏度极高，易被空气中气溶胶污染。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和带滤芯的枪头。

实验流程

1. 在qPCR管中配制如下混合液

2 × ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Without ROX)	10.0 μl
Primer1 (10 μM)	0.4 μl
Primer2 (10 μM)	0.4 μl
Template DNA/cDNA	x μl
ddH_2O	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℃	30 sec
Stage 2	循环反应[b]	Reps: 40	95℃	10 sec
			60℃	30 sec
Stage 3	熔解曲线[c]	Rep: 1	95℃	15 sec
			60℃	60 sec
			95℃	15 sec

a. 该预变性条件适合绝大多数扩增反应，如模板结构复杂，可将预变性时间延长至3 min以提高预变性效果。

b. 对于300 bp以内的扩增子而言，延伸时间设置为30 sec即可；超过300 bp的扩增子，推荐延长延伸时间至60 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℃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、ddH_2O、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。