ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (High ROX Premixed)

Q441

Version 23.1

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2 × 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。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。此外，本品可利用不同染料混合后产生的变色效应追踪移液过程，从而显著减少移液错误。

产品组分

组 分	Q441-02 500 rxns (20 μl/rxn)	Q441-03 2,500 rxns (20 μl/rxn)
2 × ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (High ROX Premixed)[a]	4 × 1.25 ml	20 × 1.25 ml
10 × Dilution Buffer[b]	1.25 ml	5 × 1.25 ml

a. 包含dNTP，Mg^{2+}，Champagne Taq DNA Polymerase，SYBR Green I等。
b. 10 × 黄色浓缩模板稀释液。

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。

适用范围

本产品广泛适用于动物，植物以及微生物等DNA的扩增反应。

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 1 (高浓度)，适用于以下荧光定量PCR仪：

Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus;
以及其他需要添加高浓度ROX Reference Dye的荧光定量PCR仪。

注意事项

本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及其他非合理用途。

ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix中包含蓝色染料，10 × Dilution Buffer中包含黄色染料。当ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (蓝色)中加入了用Dilution Buffer稀释的扩增模板(黄色)后会产生蓝色→绿色的变色效应，从而可以根据液体颜色准确判断是否已加入模板。

1. 10 × Dilution Buffer为专用浓缩模板稀释液。使用过程中，如需要进行移液追踪，则根据下表选择合适的方式提前添加Dilution Buffer至模板中，然后进行qPCR检测；如不需要进行移液追踪，则不使用Dilution Buffer即可。

模板状态	实例	10 × Dilution Buffer使用方式	模板中Dilution Buffer浓度
斑块/粉末	未溶解DNA沉淀斑块	使用ddH_2O将10 × Dilution Buffer稀释至1 ×， 将合适体积的1 × Dilution Buffer用作溶解液溶解斑块/粉末	1 ×
溶液	cDNA溶液，已溶解的质粒、基因组	如有必要，先使用ddH_2O将模板稀释至目标浓度， 然后在每9 μl模板中加入1 μl 10 × Dilution Buffer	1 ×

▲实际使用过程中也可使用其他添加方案，总的使用原则为最终模板中Dilution Buffer浓度为1 ×。

2. 如使用Dilution Buffer进行移液追踪(qPCR模板中已包含1 × Dilution Buffer)，模板使用体积请勿超出2 - 5 μl/20 μl reaction范围。如果模板使用量低于2 μl/20 μl reaction，会造成显色偏淡，影响追踪效果；如果模板使用量高于5 μl/20 μl reaction，Dilution Buffer中的有效成分有可能会干扰qPCR反应。
3. Dilution Buffer如果使用方式不当，有可能对qPCR结果产生一定的影响。
4. 本品附赠一块白色加样底板，当使用透明管/板进行混样时，将底板垫于透明管/板下方可显著提高颜色对比度，使移液追踪更轻松。

实验流程

1. 在qPCR管中配制如下混合液

组 分	体积
2 × ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (High 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_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。

特别提醒 1：当模板中已经包含1 × Dilution Buffer时，模板加入体积切勿超出2 - 5 μl/20 μl reaction范围。推荐范围内模板使用体积越大，颜色变化越明显。

特别提醒 2：当模板类型为未稀释 cDNA 原液时，不论其是否包含1 × Dilution Buffer，使用体积均不应超过qPCR 反应总体积的1/10，即2 μl/20 μl reaction。

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	使用仪器默认熔解曲线采集程序		

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。

* 荧光信号采集。

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。

◇ 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。