

【产品概述】

本产品是专用于染料法（SYBR Green I）的通用型实时荧光定量 PCR 预混液。产品使用抗体封闭的 HotStart Taq DNA Polymerase 具有特异性强、检测灵敏度高等诸多优点；搭配精心优化的缓冲体系可以确保极高的扩增效率，并在广泛的定量区间获得良好的扩增曲线。本产品适用于针对 DNA 或 cDNA 模板的高特异性、高灵敏度 qPCR 检测。SYBR Green 染料法同时可以进行扩增产物的熔解曲线分析，用于检测引物特异性等。

本预混液中含有特殊调配的通用型 ROX 参比荧光染料，适用于不同型号的 qPCR 仪器，无需根据仪器型号选择不同 ROX 浓度的预混液或另外调整反应体系中的 ROX 浓度。

【产品组分】

组 分	M4QS07-01 (100 rxns)	M4QS07-02 (500 rxns)
2× Universal HotStart SYBR qPCR Master Mix	1 mL	5×1 mL

【储存和运输】

干冰或冰上运输，-25~-15℃避光保存；避免反复冻融。

【实验操作】

1. 推荐的反应体系（20 μL）

组 分	推荐用量	推荐终浓度
2× Universal HotStart SYBR qPCR Master Mix	10 μL	1×
Forward Primer (10 μM)	0.4 μL	0.1 - 1 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μL	0.1 - 1 μM
DNA / cDNA	x μL *	-
ddH ₂ O	9.2 - x μL	To 20 μL

* 根据模板类型及复杂程度调整用量；使用 cDNA 原液做模板时，用量不超过总体积的 1/10。



2. 推荐两步法 qPCR 扩增，设定“参比荧光”为“ROX”

步骤	温度	时间	荧光信号	循环数
Pre-denaturation	95°C	3 min	-	1
Denaturation	95°C	10 sec	-	40
Annealing/Extension	55-65°C	5-20 sec*	采集 SYBR Green 信号	
【可选】Melting curve	按荧光定量 PCR 仪默认推荐的熔解曲线程序即可			

* 可以根据设备性能及目的片段长度适当调整扩增时间。

【常见问题与解决方案】

常见问题	解决方案	
A: 扩增曲线异常	扩增曲线不光滑	进行系统矫正；提高模板浓度
	扩增曲线断裂或下滑	模板浓度较高，可降低模板浓度或分析时设定较少的基线循环数
	个别扩增曲线骤降	反应管内留有气泡，样本上机前离心
B: 反应结束无扩增曲线	循环数不够	建议设置循环数为 40
	程序中未正确设置信号采集	两步法一般在退火/延伸阶段采集信号；三步法在延伸阶段采集信号；设置正确的荧光类型
	引物降解	PAGE 电泳检测引物完整性
	模板浓度低	未知样品从高浓度做起，降低稀释度
	模板降解	重新制备模板
C: 重复性差	加样不准确	更换移液枪；扩大反应体积
	qPCR 预混液未混匀	使用前充分解冻并混匀预混液
D: Ct 值过高	PCR 产物过长	建议 PCR 产物长度 80-150 bp
	模板降解	重新制备模板
	扩增效率低	优化反应条件，尝试三步法扩增；重新设计引物
	反应体系中存在抑制剂	若为模板带入，可加大模板稀释倍数或重新制备模板
	模板浓度低	减少稀释倍数，重复实验
E: 标准曲线线性关系不佳	加样误差	加大模板稀释倍数，提高加样体积
	标准品降解	重新制样，重复实验
	模板浓度太高	增加模板稀释倍数

