

2×UniTaq SYBR qPCR Master Mix (ROX-)

【产品简介】

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 Taq Polymerase 是基于抗体法修饰的热启动聚合酶, 具有特异性强、检测灵敏度高、扩增产量高等特点。配合特殊优化的 buffer, 可进行高特异性、高灵敏的 qPCR 扩增。本产品不含 ROX。

【货 号】 P1504

【规 格】

产品名称	规格	保存温度
2×UniTaq SYBR qPCR Master Mix(ROX-)	5ml	-20℃

【保存条件】

-20℃避光保存 1 年, 解冻后可于 2~8℃避光存放 6 个月; 低温运输。

【适用范围】

本试剂用于 DNA 样本的扩增, 可以扩增各物种来源的 DNA, 样本类型可以是基因组 DNA、cDNA、质粒 DNA 等

【使用说明】

1、反应液配制 (以 20ul 体系为例)

试剂名称	使用量	终浓度
2×UniTaq SYBR qPCR Master Mix	10 ul	
Forward Primer(10uM)	0.6 ul	0.3 uM
Reverse Primer(10uM)	0.6 ul	0.3 uM
DNA sample	X ul	
RNase free water	Up to 20ul	

注: a、引物的添加量以各引物的最终浓度为 0.2~0.6uM, 当扩增效率低时, 可通过优化添加量来提高反应性能, 但要注意添加量过多时可能会产生非特异性扩增。

b、如模板为未稀释的 cDNA 原液, 使用体积不应超过反应总体积的 1/10, 过高的模板量会抑制反应的正常进行。

2、反应条件

以 qPCR 的基础循环为例, 具体循环条件可根据需要进行调整。

预变性	95℃	2min
↓		
PCR 循环	95℃	15s
	60℃	30s (40cycles)

a、该预变性条件适合大多数扩增反应, 如模板结构复杂, 可将预变性时间延长至 5min 以获得更好的效果。

b、延伸的温度请在 55~72℃的范围内进行优化, 可改善检测的灵敏度。

c、融解程序使用默认程序。

【注意事项】

- 1、使用前应完全解冻，混匀后再使用。
- 2、本品应尽量避免反复冻融，以免造成酶活性的下降和 dNTPs 的降解。如每次用量较少，推荐小份分装使用。
- 3、由于本产品检测灵敏度极高，易被空气中的气溶胶污染，因此配制混合体系时请于超净工作台中操作，配制过程中请使用灭菌枪头、反应管，条件允许时使用专用移液器和带滤芯的吸头。

【FAQ】

◇扩增曲线异常

- 1、扩增曲线非正常抖动：信号强度弱，通过系统校正后产生。提高模板上样量重复实验或更换高质量模板。
- 2、扩增曲线断裂或下滑：模板浓度过高产生了反应抑制；基线扣除错误。降低模板上样量或将模板稀释后再上样；手动调整基线终点至 CT 值-3，重新分析
- 3、偶发个别曲线骤降：反应孔内有气泡残余。加样时要小心，进行反应前要仔细检查反应孔内是否有气泡残余，若有，可轻弹后离心即可消除。

◇扩增结束后无扩增曲线出现

- 1、确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法中，信号采集设置在退火延伸阶段；三步法中，信号采集设置在 72℃ 延伸阶段。
- 2、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，以排除由于引物降解导致无扩增现象。
- 3、模板浓度太低：减少稀释度重新实验，一般从高浓度开始做起。
- 4、模板降解：重新制备模板，重复实验。

◇CT 值较大

- 1、扩增效率极低：优化实验条件，尝试三步法扩增程序，或重新设计合成高特异引物。
- 2、模板浓度过低：减少稀释度或增加上样量。
- 3、模板降解：重新制备模板，重复实验。
- 4、反应体系中存在抑制剂：重新制备模板或使用 qPCR 专用的抽提、反转试剂盒

◇阴性对照出现明显扩增

- 1、反应体系存在污染：更换新的 Master Mix、水、引物重新实验。配制反应时应避免气溶胶污染。
- 2、引物二聚体出现：根据融解曲线进行分析，必要时重新设计引物。

◇融解曲线出现多峰

- 1、引物设计不优：根据设计原则重新设计合成引物。
- 2、引物浓度过高：适当减低引物浓度
- 3、模板存在基因组污染：重新制备模板或使用 qPCR 专用反转录试剂。

◇绝对定量标准曲线拟合程度差

- 1、加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积减少误差。
- 2、标准品降解：重新制备标准品，重复实验。
- 3、模板浓度过高：提高模板稀释度重新实验

◇实验重复性差

- 1、加样误差大：使用性能优良的移液器；提高模板稀释度，以大体积加样。
- 2、模板浓度过低：模板浓度低，重复性越差，减少模板稀释度或提高上样体积。
- 3、仪器失准：定期校准仪器。