

Rdl Green qPCR Mix (Low ROX) 2 ×

说明书

产品编号：AP60C-1.25ML(125 次*20 μ l)，AP60C-1.25ML*4 (500 次*20 μ l)

规格：1.25 ml, 1.25 ml × 4

包装单位：125 次-20 μ l 反应体系，500 次-20 μ l 反应体系

储存条件

-20℃避光保存，有效期至少 1 年；若频繁取用，解冻后可存放于 4℃，使用期限不超过 3 个月；应避免反复冻融。

产品简介

本产品为基于 SYBR Green I 嵌合荧光法的实时荧光定量 PCR 专用试剂。试剂盒已经预混合 2 × 浓缩预混液，内含热启动 HotMaster Taq DNA 聚合酶、dNTP、专用稳定剂、优化反应缓冲液、BSA 以及 SYBR Green I。

具备灵敏度高、特异性强、稳定性优异的特点。实验时仅需补加模板、引物与水，即可获得质量良好的标准曲线，实现目的基因的准确定量，实验重复性与可信度佳。

本产品所使用 HotMaster Taq DNA 聚合酶工作原理区别于普通热启动酶：普通热启动酶仅在升温前封闭酶活性；HotMaster Taq DNA 聚合酶依靠抑制剂调控底物结合位点。温度低于 40℃时形成无活性的酶-抑制剂复合物；升温至引物适宜退火温度后，平衡向模板-特异性引物复合物方向偏移，可在整个 PCR 过程最大限度减少非特异性扩增，提升 qPCR 检测准确度。

注意事项

1. 本预混液已添加低浓度 ROX 参比染料，适配仪器：ABI 7500、7500 Fast、Q6、ViiA™7、QuantStudio Dx/3/5、Quant Studio 6/7Flex；Stratagene MX4000、MX3005、MX3000；Corbett Rotor Gene 3000 以及其他需要低 ROX 的机型。ROX 用于消除背景信号，校正不同反应孔之间的荧光偏差。

2. 使用前轻柔颠倒混匀预混液，禁止涡旋震荡，防止产生大量气泡干扰定量；混匀后短暂离心即可上样。

3. 试剂含有 SYBR Green I，长时间强光照射会造成染料分解、灵敏度下降，操作过程避免强光长时间直射。

4. 建议全程在冰上配制 PCR 反应体系，再上机扩增，可提高扩增特异性，降低背景。

反应体系配制（冰上操作）

反应组分	20 μ l 体系加入体积	50 μ l 体系加入体积	终浓度
SYBR qPCR Mix (Low Rox) 2 ×	10 μ l	25 μ l	1 ×
DNA Template	1 μ l	2 μ l	根据实验需求
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l	1 μ l	0.2 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l	1 μ l	0.2 μ M
ddH ₂ O 补足至终体积	至 20 μ l	至 50 μ l	—

PCR 扩增程序

二步法（推荐首选）

plaintext ^	
95 °C	2 min
95 °C	15 sec
60 °C	30-34 sec
40个循环	
溶解曲线阶段	

三步法

plaintext ^	
95 °C	2 min
95 °C	15 sec
60 °C	15-20 sec
72 °C	20-30 sec
40个循环	
溶解曲线阶段	

> 程序说明：试剂适配多品牌 qPCR 仪，二步法、三步法均可得到较好结果，可结合仪器说明与实际样本微调参数。二步法扩增特异性更优；三步法扩增效率更高。

> 若熔解曲线特异性差：二步法退火温度每次上调 2- 3 °C；

> 若引物 T_m 值偏低扩增效果不理想：二步法可将延伸时间延长至 60 sec，或改用三步法扩增。

常见问题及处理方案

Q1：无荧光信号

1. 循环数不足：一般设置 ≥ 35 个循环，最高可调整至 45 循环；超过 45 循环背景会显著升高。

2. 荧光采集时机错误：SYBR- Green 法一般在 72 °C 延伸阶段采集信号；TaqMan 探针法常在退火或延伸结束采集。

3. 引物发生降解：可通过 PAGE 电泳检测引物完整性。

4. 引物设计缺陷，退火温度设置不合理。

5. 模板投入量不足；未知浓度样本优先从高浓度梯度开始测试。

6. 模板降解；制备样本避免杂质引入，减少模板反复冻融。

Q2：Ct 值明显偏大（出峰过晚）

1. 扩增效率偏低，条件需优化：重新设计引物；切换三步法；适度降低退火温度；优化镁离子浓度。

2. PCR 组分降解，或加样量不足。

3. PCR 产物片段过长，建议产物长度 100- 150 bp，尽量不超过 500 bp。

Q3：标准曲线线性差

1. 移液加样误差，标准品稀释梯度失效。

2. 标准品降解；避免反复冻融，重新配制稀释标准品。

3. 引物性能不佳，重新设计引物。

4. 模板含有 PCR 抑制物，或是模板浓度过高。

Q4：阴性对照出现扩增信号

1. 体系或纯水被污染：更换全新 Mix 或纯水重做实验；体系配制在超净台完成，降低气溶胶污染。

2. 引物二聚体：35 循环之后阴性对照起峰属于常见现象，结合熔解曲线综合判读结果。