

Taq SYBR[®] Green qPCR Premix (Rox Separated)

REF: EG22104M

储运条件

长期保存请于 -20°C 避光保存，Mix 融解后可在 4°C 避光条件下稳定存放一个月，尽量避免反复冻融。

产品组成

组分	规格
Taq SYBR [®] Green qPCR Premix (None Rox)	5×1 ml
Low ROX Dye (100×)	100 μl
High ROX Dye (100×)	100 μl

产品简介

Taq SYBR[®] Green qPCR Premix 是 SYBR[®] Green I 嵌合染料法专用 qPCR 试剂，为 2× 预混液，包含除引物和 DNA 样品以外的所有 qPCR 组分，可减少操作步骤，缩短加样时间，降低污染几率。其核心组分是经抗体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶，配合精心优化的 Buffer 体系以及 PCR 反应促进因子，使产品具有特异性强、扩增效率高等特点，有效抑制非特异性扩增，可对宽广浓度范围的模板进行准确定量，获得稳定可靠的 qPCR 结果。

使用方法

1. 适配机型

产品	适用机型
None ROX	Bio-Rad CFX 全系列； Roche LightCycler™ 系列； Eppendorf Mastercycler [®] ep realplex 系列； Qiagen/Corbett Rotor-Gene [®] 系列； Takara Thermal Cycler Dice； analytikjena qTOWER 系列等
Low ROX	ABI 7500/7500 Fast, ABI ViiA 7™； ABI QuantStudio™ 系列； Stratagene Mx3000P [®] /3005P™/4000™
High ROX	ABI 7000/7300/7700/7900 HT/7900 HT Fast, StepOne™, StepOne Plus™ 等

2. 使用注意

- ① 因 Mix 中预混有染料，其保存或反应体系配制过程应避免强光照射；
- ② 使用前上下颠倒轻轻混匀 Mix，请勿涡旋振荡混匀，避免产生过多气泡；
- ③ 可在首次试验前根据“适配机型”表格内容选择合适的 ROX Dye 一次性加入 Mix 管内。加入终浓度为 2×（1 ml mix 加入 20 μl ROX Dye）。

3. 建议的 qPCR 反应体系

试剂	使用量	终浓度
Taq SYBR [®] Green qPCR Premix	10 μl	1×
正向引物 (10 μM) ^a	0.4 μl	0.2 μM
反向引物 (10 μM) ^a	0.4 μl	0.2 μM
ROX (依据机型选择)	0.2 μl	1×
DNA 模板 ^b	X μl	10~200 ng/20 μl
Nuclease-Free Water	To 20 μl	

a. 通常推荐的引物终浓度为 0.2 μM，反应效果不佳时可在 0.1~1 μM 范围内进行调整；

b. 推荐模板加样量为 1~2 μl，如模板类型为未稀释 cDNA 原液，模板添加量不应超过总反应体系的 10%。不同种类 DNA 模板中含有的靶基因拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，以确定最佳的 DNA 模板添加量。

4. qPCR 反应程序（可根据机型适当调整）

两步法

步骤	温度	时间	
预变性	95°C	30 sec	
变性	95°C	10 sec	← 40 Cycles
退火 & 延伸 ^a	60°C	30 sec	
熔解曲线 ^b	使用仪器默认采集程序		

三步法

步骤	温度	时间	
预变性	95°C	30 sec	
变性	95°C	10 sec	← 40 Cycles
退火 ^a	55~65°C	10 sec	
延伸 ^a	72°C	30 sec	
熔解曲线 ^b	使用仪器默认采集程序		

a. 根据引物的 T_m 值进行退火 & 延伸（退火）温度的设定；若扩增片段在 200 bp 以内，退火 & 延伸（延伸）时间可以设置为 15 sec；此外，退火 & 延伸（延伸）时间的设置还需根据您使用的 qPCR 仪所需要的最短数据采集时间自行调整；

b. 不同 qPCR 仪的熔解曲线采集程序有差别，一般可使用仪器默认的熔解曲线采集程序。

5. 实验优化

若使用默认反应条件反应性能不佳时，则需要对反应条件进行优化，可以从引物浓度以及扩增程序两个方面进行：

① 引物浓度调整

当引物终浓度在 0.1~1.0 μM 范围之间变化时，引物浓度越低，扩增特异性越高，但扩增效率会有所下降。

② 扩增程序优化

需提高扩增特异性，可使用两步法程序或提高退火温度；需提高扩增效率，可使用三步法程序或延长延伸时间。

6. 引物设计原则

- ① 扩增产物长度建议控制在 80~200 bp；
- ② 引物长度为 18~25 bp；
- ③ 正向引物和反向引物的 T_m 值相差不超过 1°C 为佳， T_m 值控制在 58~62°C 为佳；
- ④ 引物的 GC 含量控制在 40%~60% 之间；
- ⑤ 引物 A、G、C、T 整体分布尽量要均匀，避开 T/C 或者 A/G 的连续结构（特别是 3' 端）；
- ⑥ 引物 3' 端最后一个碱基最好为 G 或者 C；
- ⑦ 避开引物内部或者两条引物之间的互补序列；
- ⑧ 使用 NCBI BLAST 功能检索确认引物的特异性。

常见问题

问题描述	可能原因	解决办法
扩增曲线不光滑	荧光信号太弱，经系统校正后产生	确保 Mix 中预混的染料未降解；更换荧光信号收集更好的 qPCR 专用耗材
扩增曲线断裂或下滑	模板浓度较高，基线的终点值大于 Cq 值	减小基线终点 (Cq 值 -4)，重新分析数据
个别孔扩增曲线突然骤降	反应管内留有气泡	确保 Mix 完全溶解，请勿涡旋振荡混匀 加样完成后轻弹离心去除气泡 延长预变性时间至 10 min，以去除气泡
反应结束无扩增曲线出现	反应循环数偏少	设置循环数为 40，但更多的循环数会增加过多的背景信号
	荧光信号采集步骤未设置或者设置错误	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°C 延伸阶段
	引物可能降解	长期未用的引物，应先通过 PAGE 电泳检测完整性，以排除其降解的可能
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数重复实验，样品浓度未知的情况下先从最高浓度做起
	模板降解	重新制备模板，重复实验
Cq 值出现过晚	扩增效率低	提高引物浓度，尝试三步法扩增程序，或者重新设计引物
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数重复实验，样品浓度未知的情况下先从最高浓度做起
	模板降解	重新制备模板，重复实验
	扩增产物过长	扩增产物长度控制在 80~200 bp
	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重新制备纯度高的模板重复实验
空白对照出现信号	反应体系污染	首先更换空白对照的水，如果还发生同样情况，继续更换引物、吸头、PCR 管或启用新的 Mix 反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染
	出现引物二聚体等非特异性扩增	一般在 35 循环以后空白对照出现扩增产物属正常情况，应配合熔解曲线进行分析 重新设计引物，调整引物浓度或优化 PCR 反应程序
熔解曲线出现多峰	引物设计不佳	根据引物设计原则重新设计新引物
	引物浓度过高	适当降低引物浓度
	cDNA 模板存在基因组污染	提取后的 RNA 溶液使用 DNA 酶进行消化，例如：dsDNase，以去除基因组污染，或设计跨内含子引物
实验重复性差	加样误差大	使用精准的移液器、配合高品质吸头准确移液 高倍稀释模板，加入大体积模板减少加样误差 放大 qPCR 反应体积
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数重复实验
	qPCR 仪不同位置的温度偏差	定期校准 qPCR 仪