

HRbio™ qPCR SYBR® Green Master Mix (No Rox)

产品信息

产品名称	产品编号	规格	储存
HRbio™ qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox)	HRF0031	1 mL	-20°C避光
	HRF0032	5×1 mL	-20°C避光
	HRF0033	50×1 mL	-20°C避光

产品描述

HRbio™qPCR SYBR Green Master Mix(No Rox)是 2×实时定量 PCR 扩增的预混合溶液。Mix 中含有热启动 HRbio™ DNA Polymerase 、SYBR Green I 、dNTPs、Mg²⁺。使用时, 仅需在扩增体系中加入模板和引物即可进行实时荧光定量 PCR ,大大 简化操作过程,降低污染几率。

本品采用的 DNA 聚合酶配体可以随温度变化实时调节 DNA 聚合酶活性。配方添加了有效抑制非特异性 PCR 扩增的因子和提升 PCR 反应扩增效率的因子,使定量 PCR 可以在宽广的定量区域内获得良好的线性关系。

适用机型

Bio-Rad: CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ5, MyiQ, MiniOpticon, Opticon, Opticon 2, Chromo4;
Eppendorf: Mastercycler ep realplex, realplex 2 s;
Qiagen: Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000;
Roche Applied Science: LightCycler 480, LightCycler 2.0; Lightcycler 96;
Thermo Scientific: PikoReal Cycler; Cepheid: SmartCycler; Illumina: Eco qPCR.

运输和保存方法

冰袋运输。-20°C保存, 有效期 18 个月。

本品避免反复冻融。产品中含有荧光染料 SYBR Green I, 保存或配制反应体系时需避免强光照射。

注意事项

- 1) 推荐使用本公司 cDNA 合成试剂盒, 以有效去除 RNA 样品中残留的基因组。
- 2) 解冻后 Master Mix 可能出现絮状物质, 4°C放置并上下颠倒混匀至溶液澄清, 不影响试剂性能。
- 3) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
- 4) 本产品仅作科研用途!

反应体系 (推荐冰上配制)

组分	体积 (μL)	体积 (μL)	终浓度
HRbio™ qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox)	25	10	1×
Forward Primer (10 μM)	1	0.4	0.2 μM
Reverse Primer (10 μM)	1	0.4	0.2 μM
模板 DNA	X	X	-
无菌超纯水	To 50	To 20	-

【注】：使用前务必充分混匀，避免剧烈震荡产生过多气泡。

- 引物浓度：通常引物终浓度为 0.2 μM，也可以根据情况在 0.1- 1.0 μM 之间进行调整。
- 模板浓度：如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。
- 模板稀释：cDNA 原液建议 5- 10 倍稀释，最佳模板加入量以扩增得到的 CT 值在 20-30 个循环为好。
- 反应体系：推荐使用 20 μL 或 50 μL，以保证目的基因扩增的有效性和重复性。
- 体系配制：请于超净工作台内配制，并使用无核酸酶残留的枪头、反应管；推荐使用带滤芯的枪头。避免交叉污染 和气溶胶污染。

扩增程序 (两步法)

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	10 sec	40
退火/延伸	60°C	30 sec★	
熔解曲线阶段	仪器默认设置	1	

扩增程序 (三步法)

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	10 sec	40
退火	55-60°C	20 sec	
延伸	72°C	20 sec★	
熔解曲线阶段	仪器默认设置	1	

【注】高特异性可选择两步法，高效率扩增可选择三步法。

- 预变性时间：根据不同模板和引物的具体情况可适当缩短至 2 min。
- 退火温度和时间：请根据引物和目的基因的长度进行调整。
- 荧光信号采集 (★)：请按照仪器使用说明书要求进行实验程序设置，几种常见仪器的时间设定如下：
 30sec 以上：Applied Biosystems: StepOne, StepOne Plus, 7500 Fast; Roche Applied Science: LightCycler 480; Bio-Rad: CFX96

31sec 以上: Applied Biosystems: 7300

34sec 以上: Applied Biosystems: 7500

d) 熔解曲线: 通常情况下可以使用仪器默认程序。

结果分析

定量实验至少需要三个生物学重复。反应结束后需要确认扩增曲线及熔解曲线。

1) 扩增曲线:

标准扩增曲线为 S 型。Ct 值落在 20-30 之间时, 定量分析最准确; Ct 值小于 10, 需要将稀释模板后, 重新进行实验; Ct 值介于 30-35 之间时, 需要提高模板浓度, 或者增大反应体系的体积, 以提高扩增效率, 保证结果分析的准确性; Ct 值大于 35 时, 检测结果无法定量分析基因的表达量, 但可用于定性分析。

2) 熔解曲线:

熔解曲线单峰, 表明反应特异性好可以进行定量结果分析; 若熔解曲线出现双峰或者多峰, 则不能进行定量分析。熔解曲线出现双峰, 需要通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳判断非目标峰是引物二聚体还是非特异性扩增。

如果是引物二聚体, 建议降低引物浓度, 或者重新设计扩增效率高的引物。

如果是非特异性扩增, 请提高退火温度, 或者重新设计更高特异性的引物。

引物设计指南

1. 推荐引物长度 25 bp 左右。扩增产物长度 150 bp 为佳, 可以在 100 bp-300 bp 内选择。
2. 正向引物和反向引物的 Tm 值相差不宜超过 2°C。引物 Tm 值 60°C-65°C 为佳。
3. 引物碱基分布要均匀, 避免出现连续的 4 个相同碱基, GC 含量控制在 50% 左右。3' 端最后一个碱基最好为 G 或 C。
4. 引物内部或者正反两条引物间最好避免出现有 3 个碱基以上的互补序列。
5. 引物特异性需要用 NCBI BLAST 程序进行核对。避免引物 3' 端有 2 个碱基以上的非特异性互补。
6. 设计完成的引物需要进行扩增效率的检测, 只有具备相同扩增效率的引物才可用于定量比较分析。