



**Targetmol[®] SYBR Green qPCR Master Mix
(High ROX)**

使用说明书
Instruction Manual

产品描述

SYBR Green qPCR Master Mix (High ROX) 是一种 2× 浓度的即用型预混液。

Mix 中含有热启动 DNA Polymerase、SYBR Green I 荧光染料、dNTPs、Mg²⁺ 及 High Rox。使用时，只需加入模板、引物、无菌超纯水便可进 Real Time PCR 反应。操作简单方便，降低污染概率。

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，对靶基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。

适用机型

本品含有 High ROX Reference Dye，适用于需要校正孔间荧光信号误差的仪器：

Applied Biosystems: 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne, StepOne Plus

保存条件

- 1、-20°C 避光储存，有效期 24 个月。
- 2、请尽量避免反复冻融，如需频繁使用请先提前分装保存。
- 3、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。

反应体系

*以50 μL 和20 μL 为例，推荐冰上配制

组分	体积 (μL)	体积 (μL)	终浓度
qPCR SYBR Green Master Mix (High ROX)	25	10	1 \times
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	
总反应体系	50	20	

【注】：使用前务必充分混匀，避免剧烈震荡产生过多气泡。

a) 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。

b) 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。

c) 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。

d) 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。

e) 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

步骤	I	II		III
	热启动酶激活	PCR		熔解曲线
	预变性	40 cycles		1 cycle
		变性	退火/延伸	
温度	95°C	95°C	60°C	仪器默认设置
时间	5 min	10 sec	30* sec	
反应体系	20 µL- 50 µL			

三步法

步骤	I	II			III
	热启动酶激活	PCR			熔解曲线
	预变性	40 cycles			1 cycle
		变性	退火	延伸	
温度	95°C	95°C	55-60°C	72°C	仪器默认设置
时间	5 min	10 sec	20 sec	20* sec	
反应体系	20 µL- 50 µL				

【注】：高特异性可选择两步法，高效率扩增可选择三步法。

a) 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。

b) 退火温度和时间：请根据引物和目的基因的长度进行调整。

c) 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

结果分析

- 1、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溶解曲线。
- 2、扩增曲线：一般 CT 值的正常范围为 15-35 之间，其中 20-28 之间的定量最为准确。如果 CT 值过小，则需重新稀释模板；如果 CT 值过大，则需适当提高模板浓度、提高引物浓度以及调试最佳 qPCR 程序。
- 3、溶解曲线：通常只有溶解曲线为单峰时，才为有效定量结果。如果溶解曲线出现多峰，则需优化条件重新实验，常见方法通常需要重新设计引物等。

注意事项

- 1、SYBR Green Master Mix (High ROX) 在 -80°C 存放可能会产生白色或淡黄的沉淀，可用手握缓慢溶解，于室温短时间避光放置，轻柔上下颠倒混匀直至沉淀全部消失。不影响试剂性能。
- 2、使用前，请上下轻轻颠倒混匀，避免产生气泡，然后进行短暂的离心，防止因混合不均匀造成反应效果不佳。
- 3、避免反复冻融，防止聚合酶活性下降，可将产品分装保存，以便小剂量的多次使用。
- 4、由于 SYBR Green I 荧光染料随着时间的推移可能会在光照下褪色，从而导致敏感性下降，因此在存储和使用过程中要避免强光照射。
- 5、由于 qPCR 反应的高灵敏度，空气或气溶胶的污染可能导致反应失败或结果不准确。因此请使用无菌的针尖、灭菌过的试管和移液管在清洁的环境中进行 qPCR 反应。
- 6、为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作，再配置反应体系或者分装时请一定使用新(无污染)枪头、Microtube 等，避免污染。
- 7、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。



400-821-2233
tech3@targetmol.com
www.targetmol.com