【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的合格产品。 在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。

网站：www.sidingbio.com
订购：15213057346(微信、QQ)
技术支持：13677619210

2x SD SYBR qPCR Mix(-Rox)

名称	货号	规格	保存
2×SD SYBR qPCR Mix	SDM0018	5×1mL	-20℃

【产品描述】

2×SD SYBR qPCR Mix(-Rox)是采用新型超灵敏SYBR染料，其吸收波长及激发波长与SYBR GreenI一致，专用于染料法(SYBR Green I)定量PCR实验。本产品包含了快速热启动SD Taq DNA Polymerase、PCR Buffer、dNTPs、新型SYBR荧光染料和Mg2+。主要用于基因组DNA靶序列或cDNA靶序列检测。本产品所含新型SYBR染料可以特异性地与双链DNA结合，其稳定性极高，冻融后不会对PCR反应进行抑制(SYBR GreenI冻融后会产生PCR抑制剂)。本产品在反复冻融10次后依旧能获得一致的Ct值。本产品含有特殊修饰的快速热启动SD Taq DNA Polymerase，在升温过程中自动释放快速热启动SD Taq DNA Polymerase活性，无需格外设置高温激活时间。整个PCR反应过程比普通热启动PCR反应节省约50min,大大缩短了获得定量结果的时间。配合高效的PCR缓冲体系，新型SYBR染料和快速热启动SD Taq DNA Polvmerase，在保证高效扩增效率的同时有效地抑制了非特示性产物及引物二聚体的产生，显著地提高PCR效率，增加结果的稳定性。本产品不含ROX染料。

- 新型超灵敏SYBR染料显著提高检测的灵敏度，试剂的稳定性；
- 配体/适配体修饰法制备的热启动酶，提高灵敏度，增强特异性，缩短反应时间；
- 针对qPCR优化的反应缓冲液，增强特异性，减少引物二聚体形成，提高扩增效率，重复性好，可信度高。

【推荐qPCR体系（以20 μl反应体系为例）】

组分	50uL体系	20uL体系	10uL体系	终浓度
2×SD SYBR qPCR Mix	25	10	5	1×
10 μM Forward Primer	1	0.5	0.4	0.2 μM
10 μM Reverse Primer	1	0.5	0.4	0.2 μM
Template	1	1	1	*
ddH2O	22	8	3.2	

注:*基因组DNA加入10-100ng，cDNA作为模板加入1-10ng当量模板。

反应体系中各成分的量可根据以下原则进行调整：

- 反应体系中引物终浓度为0.2 μM即可得到较好的扩增效果。当反应性能较差时，引物终浓度可以在0.1 - 0.5 μM范围内进行调整。
- qPCR灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确度对最终结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。
- 如模板为未稀释cDNA原液，使用体积不应超过qPCR反应总体积的1/10。

【PCR条件】

2步法	温度	时间	循环数
预变性	94℃	20S	1
变性a	94℃	10S	40
退火/延伸b	60℃	20S	
溶解曲线c	仪器默认	仪器默认	1

a. 绝大多数情况下94℃可以打开模板双链并被快速热启动SD Taq DNA POlymerase扩增，但扩增区域为高GC含量区域时，应该将变性时间延长到20S。

b. 退火/延伸时间请根据您使用的Real-time PCR仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整: 使用ABI 7700和7900时至少30秒；使用ABI 7000和7300时至少31秒；使用ABI 7500时至少34秒。

c. 仪器类型不同，融解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

【注意事项】

- 本品尽量避免反复冻融，以免酶活下降。如每次使用量较少，推荐分装后保存
- 使用前请上下颠倒混匀预混液，预混液经混匀瞬时离心后即可使用
- 2×SD Universal SYBR qPCR Mix于-20℃保存时，有时会形成沉淀，可在室温短时间放置后，涡旋混匀即可完全溶解。确保试剂混合均匀后再使用

- 由于本品含有荧光染料SYBR Green，因此保存预混液，以及配制反应体系时都应尽量避免强光照射
- 由于本品检测灵敏度极高，在配制过程中请使用干净灭菌枪头、反应管，条件容许的实验室推荐使用专用的移液器，避免污染

【常见问题与解决方案】

- 阴性对照中有信号产生
  - **a.** 模板或试剂被核酸污染：在进行PCR反应前采取标准的预防措施，以降低污染风险
  - **b.** 产生引物二聚体：配合融解曲线进行分析
- 融解曲线出现多个峰
  - **a.** 存在引物二聚体或其他特殊结构：根据设计原则设计合成新的引物
  - **b.** 引物浓度太高：适当降低引物浓度
  - **c.** cDNA模板带有基因组污染：重新制备cDNA模板
- 定量**PCR**无扩增曲线
  - **a.** 反应循环数不够：一般设置循环数为40
  - **b.** 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段
  - **c.** 确认引物是否降解：长时间未使用的引物可能发生降解，合成新的引物，重复实验
  - **d.** 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品按最高浓度进行检测
  - **e.** 模板降解：重新制备模板，重复实验
- 定量**PCR**扩增曲线不平滑
  - **a.** 信号太弱：提高模板浓度重复实验
  - **b.** ROX类型使用错误：确认所用ROX与机型是否匹配
  - **c.** 定量PCR反应过程中体积变化：PCR管未盖严导致反应体系蒸发
- **Ct**值出现太晚
  - **a.** 扩增效率低：优化反应条件，或者重新设计合成引物
  - **b.** 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品按最高浓度进行检测
  - **c.** 模板降解：重新制备模板，重复实验
  - **d.** PCR产物太长：推荐PCR产物长度为80-150 bp
  - **e.** 反应体系中存在PCR抑制剂：一般为模板引入，加大模板稀释倍数或重新制备模板，重复实验
- 实验重复性差
  - **a.** 加样体积不准确：使用准确的移液器；增加模板稀释度，以大体积加入反应体系中
  - **b.** 模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，减少模板稀释度或提高加样体积
  - **c.** 定量PCR反应过程中体积变化：PCR管未盖严导致反应体系蒸发