



2×RealStar Fast Pro SYBR qPCR Mix

2×RealStar Fast Pro 染料法 qPCR 预混液

版本号: V231101

货号: A401
保存: -20°C避光
运输: 低温

货号	规格
A401-01	1.1 ml
A401-05	1.1 ml×5
A401-10	1.1 ml×10

【产品概述】

本产品是升级版 SYBR Green I 嵌合荧光法 qPCR 反应预混液。核心组分为经过升级改造的抗体法修饰的新一代热启动 *Taq* 聚合酶，其搭配优化的 qPCR Buffer，具有扩增速度快，灵敏度高，特异性强等特点，适用于基因组 DNA 和 cDNA 模板的扩增，对不同 GC 含量（30%-75%）基因扩增均有非常高的扩增效率。

本产品为 2×浓度 qPCR 预混液，使用时只需加入模板、引物、水和 ROX（根据机型选择 ROX Reference Dye，以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差），使其工作浓度为 1×，即可进行反应。

【产品组分】

组分货号	组分名称	A401-01	A401-05	A401-10
ZA401-101	2×RealStar Fast Pro SYBR qPCR Mix	1.1 ml	1.1 ml×5	1.1 ml×10

注：不同仪器所需 ROX Reference Dye 不同，如需添加，需致电本公司或向服务您的销售人员索取：

需加 High ROX Reference Dye (50×)的机型: ABI Prism7000/7300/7700/7900HT 和 ABI StepOne /ABI StepOne Plus。

需加 Low ROX Reference Dye (50×)的机型: ABI Prism7500 /7500 Fast, MJ Research Chromo4, Opticon (II), Corbett Rotor Gene 3000。

无需加 ROX Reference Dye 的机型: Thermal Cycler Dice Real Time System, LightCycler, Smart Cycler System, Corbett Rotor-gene 6000, Agilent Technologies Mx3000P 等荧光定量 PCR 仪。

【保存条件】

-20°C避光保存，保质期 24 个月，避免反复冻融。如果经常使用，可置于 4°C保存至少 3 个月。

【注意事项】

- 使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
- 尽可能减少 2×RealStar Fast Pro SYBR qPCR Mix 在光下的曝露时间，长时间的曝光可导致荧光信号减弱。
- 反应液的配制、分装请一定使用无污染的气枪头、Microtube 等，尽量避免交叉污染。
- 本品不能用于杂交探针法。

【使用方法】

用户需自备的试剂：cDNA 或 DNA 模板、引物。（请按照不同品牌荧光定量 PCR 仪的使用说明书要求进行实验操作。）

操作示例：分别以 20 μl 和 50 μl PCR 反应体系为例：

- qPCR 反应体系的建立：

组分	20 μl 体系	50 μl 体系
DNA 模板 ^a	1 μl	1 μl
正向引物 (10 μM) ^b	0.4 μl	1 μl
反向引物 (10 μM) ^b	0.4 μl	1 μl
2×RealStar Fast Pro SYBR qPCR Mix	10 μl	25 μl
High/Low ROX Reference Dye ^c	0.4 μl	1 μl
Sterile Water	补足至 20 μl	补足至 50 μl

^a模板量：10-100 ng 基因组 DNA，或 1-10 ng cDNA 为参照，因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数和 GC 含量不同，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。另外 Two Step RT-PCR 反应的 cDNA (RT 反应液) 作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

^b引物：通常引物浓度以 0.2 μM 可以得到较好结果，可以终浓度 0.1-1.0 μM 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。为了获得理想的 qPCR 的效果，扩增片段的长度建议为 80-300 bp。

^c不同仪器所需 ROX Reference Dye 不同，或需要添加或不需添加，请根据仪器说明进行操作。



2. qPCR 反应条件的设置:

注: 以下举例为常规qPCR反应系统, 仅供参考。实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异, 需根据模板、引物、目的片段的特点设定最佳反应条件, 并根据比例放大或缩小反应体系。

标准qPCR反应程序:

流程	温度	时间	循环数
预变性	95°C	2 min ^d	
变性	95°C	15 s	40
退火/延伸	60°C ^e	30 s ^f	

溶解曲线 (仪器自动设置)

^d在预变性时, 通常设定为95°C 2 min, 复杂或高GC模板适当延长时间至5 min。

^e对于复杂模板、高GC含量的扩增子, 建议增加退火和延伸温度至68°C。

^f对于≥350 bp或者高GC含量的扩增子, 建议增加延伸时间至40 s或更长时间。

快速qPCR反应程序:

注: 初次扩增建议采用标准反应程序, 快速反应程序可能会损失部分扩增产量需验证后使用。

流程	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 s	
变性	95°C	5 s	40
退火/延伸 ^e	60°C ^e	10 s ^f	

溶解曲线 (仪器自动设置)

^e对于复杂模板、高 GC 含量的扩增子, 建议增加退火和延伸温度至 68°C。

^f延伸时间≤10 s, 可完成至少300 bp的扩增, 满足绝大多数的qPCR实验。对于≥350 bp或者高GC含量的扩增子, 建议增加延伸时间至40 s或更长时间。

3. 在相应的 real time PCR 仪器上完成实验, 并分析结果。

【常见问题与解决方法】

1. 扩增曲线不好或扩增效率低:

- 1) 模板质量差或浓度低, 可提高模板的纯度和浓度; 引物设计不合理, 重新设计引物。
- 2) 扩增条件不理想, 可通过延长延伸时间, 降低退火温度改善。
- 3) 如 ROX 加量过高会导致修正后荧光值低, 检查 ROX 加量是否正确。

2. 溶解曲线不正常:

- 1) 扩增非特异, 溶解曲线不是单峰, 可降低引物浓度, 也可提高退火温度提高扩增特异性。
- 2) 对于高 GC 复杂模板, 部分仪器 (如 ABI 7500 仪器) 会发生溶解曲线不完整的情况, 将溶解温度的上限设定为 99°C 可解决该问题。

3. 扩增重复性差:

- 1) 模板纯度低, 抑制 PCR 反应, 导致实验的重复性差, 可降低模板浓度或将模板纯化后再使用。
- 2) 如使用快速扩增程序出现扩增重复性差, 由于部分仪器硬件或控制用的软件原因, 退火延伸时间无法设定为 30 s, 请根据仪器的使用说明书, 合理设置退火与延伸时间。

4. 扩增曲线呈锯齿状:

- 1) 部分仪器延伸时间过短时, 荧光测定不能充分有效完成, 导致扩增曲线呈锯齿状, 延长延伸时间可得到改善。
- 2) 反应液体积太小, 少于仪器的标准规定的体积进行反应时, 会增大荧光测定值的误差, 此时应增加反应体积。

5. 基线上飘:

- 1) 模板浓度过高, 从而无法计算出正确的 Ct 值, 请适当降低模板浓度再进行反应。
- 2) 当模板纯度较低时, 所含杂质会抑制 PCR 反应。请降低模板浓度, 或将其纯化后再进行使用。

【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质量合格产品。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。