

2×Universal qPCR Fluore Green Master Mix (No ROX adjustment)

通用 qPCR 染料法预混液（无需调节 ROX）

产品简介

2×Universal qPCR Fluore Green Master Mix (No ROX adjustment)是 2×实时定量 PCR 扩增的预溶液，高灵敏度、高特异性，颜色为蓝色，具有加样示踪的作用。核心组分 Taq DNA 聚合酶采用抗体法热启动，可以有效抑制样品准备过程中引物退火导致的非特异性扩增；同时添加了提升 PCR 反应扩增效率因子和均衡不同 GC 含量（30~70%）基因扩增的促进因子，可以在较为宽泛的定量区域内获得良好线性关系。本产品中含有特殊的 ROX Passive Reference Dye，适用于所有 qPCR 仪器，无需根据不同仪器调整 ROX。

产品信息

货号	N132031E	N132031S	N132031M	N132031L
规格	50 T (20 μL/rxn)	250 T (20 μL/rxn)	2500 T (20 μL/rxn)	5000 T (20 μL/rxn)

储存条件

冰袋运输。-20℃避光储存，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 Arcegen 一链 cDNA 合成反转录预混液（Cat#N132061），有效去除 RNA 样品的残留基因。
2. 解冻后 Master Mix 可能出现絮状或白色沉淀，手握缓慢溶解并上下轻柔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. 本产品仅用于科研。

使用说明

1. 反应体系

组分	体积 (μL)	体积 (μL)	终浓度
2×qPCR Master Mix	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。

- 1) 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。
- 2) 模板浓度：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。
- 3) 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。
- 4) 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。
- 5) 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。

标准程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	2 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

快速程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	3 sec	40
退火/延伸	60°C	20 sec★	
熔解曲线阶段	仪器默认设置		1

【注】快速程序适用于绝大多数基因，个别复杂二级结构基因可尝试标准程序。

- 1) 退火温度和时间：请根据引物和目的基因的长度进行调整。
- 2) 荧光信号采集 (★)：请勿忘记打开荧光信号采集，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：
 - 20 sec: Applied Biosystems 7700, 7900HT, 7500 Fast
 - 31 sec: Applied Biosystems 7300
 - 32 sec: Applied Biosystems 7500
- 3) 熔解曲线：通常情况下可以使用仪器默认程序。

2. 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式，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。

3. 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 T_m 值相差不宜超过 2°C 。引物 T_m 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。

4. 适用机型

ABI: 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT Fast, StepOne, StepOne Plus; 7500, 7500 Fast, ViiA7,

QuantStudio 3 and 5, QuantStudio 6, 7, 12k Flex;

Stratagene: MX3000P, MX3005P, MX4000P;

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 Cyclers;

Cepheid: SmartCycler; Illumina: Eco qPCR.