

2×Color qPCR Fluore Green Master Mix (High Rox)

可示踪 qPCR 染料法预混液（高 ROX）

产品简介

2×Color qPCR Fluore Green Master Mix (High Rox)是 2×实时定量 PCR 扩增预溶液，荧光强度高，灵敏度高和特异性强，扩增产量高。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；还添加了提升 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，使定量 PCR 可以在宽泛的定量区域内获得良好的线性关系。

本产品利用不同染料的混合变色反应来监控移液操作，有效减少了移液误差的发生。

产品信息

货号	N132036E	N132036S
规格	50 T (20 μL/rxn)	250 T (20 μL/rxn)

组分信息

组分编号	组分名称	N132036E	N132036S
N132036-A	2×Color qPCR Master Mix (High Rox)	1 mL	5×1 mL
N132036-B	10×Dilution Buffer	1 mL	1 mL

储存条件

-25~-15℃避光保存，有效期 1 年。

注意事项

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
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. 使用前请上下颠倒以混匀 Master Mix，请勿 vortex 避免产生气泡，影响定量结果。Master Mix 经混匀短暂离心后即可使用。加样过程中吹打要轻，如果操作不慎 Master Mix 起泡，需再次离心方可使用。
4. 由于本品检测灵敏度极高，易被空气中气溶胶污染。因此反应体系配制时请于超净工作台内进行，配制过程中请使用灭菌枪头、反应管，条件容许的实验室推荐使用专用的移液枪和带滤芯的枪头。
5. 推荐使用本公司 cDNA 合成试剂盒（Cat#N132062），以有效去除 RNA 样品中残留的基因组。
6. 本产品仅用于科研。

使用说明

1. 模板处理

2× Color qPCR Fluore Green Master Mix (High Rox)中包含蓝色染料，10×Dilution Buffer 为专用黄色浓缩模板稀释液。使用过程中，如需要进行模板示踪，则需稀释到 1X 作为模板稀释液使用，然后进行 qPCR 检测；如不需要进行模板示踪，则不使用 Dilution Buffer 即可。

模板类型	10×Dilution Buffer 使用方式*	Dilution Buffer 终浓度
cDNA 溶液、溶解的质粒、基因组	若要稀释模板，则先使用无菌超纯水将模板稀释至目标浓度，后在每 9 μL 模板中加入 1 μL 10×Dilution Buffer。	1×
DNA 粉末	使用无菌超纯水将 10×Dilution Buffer 稀释至 1×，使用合适体积的 1×Dilution Buffer 作溶剂溶解对应的 DNA 粉末。	1×

【注】：*实际使用过程中也可按需使用其他方案，保证最终模板中 Dilution Buffer 浓度为 1×即可。

2. 推荐 qPCR 反应体系

组分	体积 (μL) ***	体积 (μL) ***	终浓度
2×Color qPCR Master Mix (High 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/cDNA**	x	x	-
无菌超纯水	Up to 50	Up to 20	-

【注】：

*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。

**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，最佳模板加入量以保证扩增得到的 Ct 值在 20-30 个循环为宜。

***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；上机前需充分混匀，避免剧烈震荡产生过多气泡。

3. 反应程序

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

【注】：

*退火温度和时间：请根据引物 T_M 值和目的基因的长度进行调整。

**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。

***熔解曲线：通常情况下可以使用仪器默认程序。

4. 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。

5. 适用机型

本产品中预混了用以校正孔与孔之间荧光信号误差的 ROX Reference Dye 1 (高浓度)，适用于以下荧光定量 PCR 仪：

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

以及其他需要添加高浓度 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪。