

Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (No Rox)

产品信息

产品名称	产品编号	规格	储存
Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (No Rox)	11201ES03	1 mL	-20°C避光
Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (No Rox)	11201ES08	5×1 mL	-20°C避光
Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (No Rox)	11201ES50	50×1 mL	-20°C避光
Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (No Rox)	11201ES60	100×1 mL	-20°C避光

产品描述

Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix(No Rox)是 2×实时定量 PCR 扩增的预混合溶液。Mix 中含有热启动 Hieff® DNA Polymerase、SYBR Green I、dNTPs、Mg²⁺。使用时，仅需在扩增体系中加入模板和引物即可进行实时荧光定量 PCR，大大简化操作过程，降低污染几率。

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。

适用机型

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 Cycler; **Cepheid:** SmartCycler; **Illumina:** Eco qPCR.

运输和保存方式

冰袋运输。-20°C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. 推荐使用本公司 cDNA 合成试剂盒（货号：11141ES），以有效去除 RNA 样品中残留的基因组。
2. 解冻后 Master Mix 可能出现絮状物质，4°C放置并上下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. 本产品仅作科研用途！

反应体系（推荐冰上配制）

组分	体积 (μL)	体积 (μL)	终浓度
Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (No 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	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。

- 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)

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5 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

扩增程序 (三步法)

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	10 sec	} 40
退火	55-60°C	20 sec	
延伸	72°C	20 sec*	
熔解曲线阶段	仪器默认设置		1

【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

d) **熔解曲线**: 通常情况下可以使用仪器默认程序。

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 时, 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量, 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。

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。