

2 x BlueTrack Universal SYBR qPCR Mix**货号:** Q488**保存条件:** -20℃避光长期储存; 4℃避光存放6个月。**产品介绍:**

本品为SYBR Green I 染料法蓝色qPCR预混液, 便于可视加样, 配合**红色**逆转录试剂盒(EnzyArtisan,货号R366)或者**黄色**cDNA稀释液(EnzyArtisan,货号Q100), 可以实现cDNA模板加入**蓝色**qPCR预混液变色, 从而为正确移液提供清晰的指示。该预混液包含qPCR所需的酶、dNTP、缓冲液、荧光染料、参比染料等组分, 使用时只需加入模板、引物、水即可。其中本品所使用的聚合酶采用了PolyLock热启动技术, 较之抗体封闭、化学修饰等热启动方式具有封闭效率高, 酶活释放快的优势。搭配针对qPCR精心优化的缓冲体系, 该预混液具有灵敏度高, 特异性强、定量范围广、重复性好的特点。另外本品预混了特殊的ROX参比染料, 可兼容所有qPCR仪器, 无需针对不同仪器额外添加相应的ROX。

产品组成:

组分	Q488-01	Q488-05
2x BlueTrack Universal SYBR qPCR Mix	4 x 1.25 mL	20 x 1.25 mL
DNase free H ₂ O	3 x 1.5 mL	15 x 1.5 mL

温馨提示:

- 本品已预混适用所有qPCR仪器的ROX参比染料, 无需额外添加ROX;
- 若解冻后管底出现沉淀(保护剂), 请颠倒混匀确保沉淀完全溶解后使用;
- 本品含有荧光染料SYBR Green I, 使用和存储时请避免强光照射;

产品使用:**A.推荐反应体系**

2 x BlueTrack Universal SYBR qPCR Mix 在冰上解冻后, 混匀, 按如下顺序加样:

2 x BlueTrack Universal SYBR qPCR mix	10 μL	5 μL
Primer-F (10 μM)	0.4 μL	0.2 μL
Primer-R (10 μM)	0.4 μL	0.2 μL
Template	x μL	x μL
DNase free H ₂ O	补足至 20 μL	补足至 10 μL

注: 引物和模板用量请根据需要调整, 引物的终浓度范围在0.1-1 μM, 通常引物的使用量增加可以提高灵敏度(Ct减小)但同时会降低特异性(出现引物二聚体等非特异性产物); 未稀释的cDNA的加入量不应超过总反应体积的1/10; 使用DNA作模板时, 请勿加入过量DNA (<500ng) 以免产生背景信号。

B.推荐反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95℃	30秒	1
变性	95℃	3-10秒	40-45
退火&延伸	60℃	10-30秒	
融解曲线	使用仪器默认程序即可		1

注: 预变性温度和时间可以根据模板复杂度进行调整, 如模板复杂度较高可以提高预变性温度并延长时间; 对于长度小于200bp的扩增子, 可以使用快速程序, 即变性时间3秒, 退火和延伸时间10秒; 对于长度大于200bp的扩增子, 请延长退火和延伸时间至30秒。对于高GC的扩增子, 可提高退火延伸温度至65℃; 循环数设置为40-45可满足绝大多数的反应; 对于Tm较低的引物, 可使用三步法, 比如退火温度设置在55℃, 延伸温度设置为72℃, 信号采集设置在延伸步骤。

相关产品推荐

货号	名称
R202	HyperScript III RT SuperMix for qPCR with gDNA Remover
R366	HyperScript RedTrack RT SuperMix for qPCR

常见问题及解决方案:

问题	可能原因	解决方案
无扩增曲线	缺少qPCR反应必需组分	确认是否加入适当的模板和引物
	反应程序设置不正确	确认选择FAM/SYBR的检测通道; 确认信号采集设置正确, 两步法设置在退火延伸步骤, 三步法设置在延伸步骤
	试剂存在污染或过期	更换新的试剂
	模板或引物存在降解	更换新的模板或引物
	模板投入量过低	适当提高模板投入量
	加样时带入了PCR抑制物质	通常抑制剂是模板纯化时残留的物质, 该情况可通过稀释模板缓解; 必要时可进一步纯化模板
复孔重复性差	模板浓度较低, 加样不精确	请避免加入小体积的低浓度模板, 该情况下可以进一步稀释模板后加入大体积
	管材封闭性存在问题	上机前请确认PCR管已被封闭好, 必要时更换管材
	组分没有充分混匀	请确保mix被充分混匀
	PCR管中存在气泡	请避免出现气泡
融解曲线不是单峰	出现T _m 值低于目的产物T _m 值的融解峰, 低T _m 值的峰一般为引物二聚体	通过NTC (不加模板的control) 确认, NTC如出现同样T _m 值较低的融解峰则可确认为由引物二聚体引起。可通过提高退火温度, 重新设计引物解决 (避免上下游引物3'端互补配对)
	出现T _m 值高于目的产物的T _m 值的融解峰, 一般认为是过度扩增造成	可通过降低模板投入量, 减少退火延伸时间解决
	使用cDNA存在基因组污染或mRNA存在可变剪切	使用DNase I 处理模板或跨内含子设计引物; 更换可以区分可变剪切的引物。
	极少数目的产物过长会分段解链形成双峰	除非必要, 请尽量将扩增子的长度控制在70-200bp的范围
标准曲线线性关系不佳	出现明显异常的点 (加样或仪器不稳定造成)	剔除异常点进行计算
	标准品降解	更换新的标准品
	反应液中引入了抑制物	找到抑制物来源, 更换相应组分
	NTC存在污染	更换试剂及实验环境 (可在紫外灭菌后的超净台操作)
	低模板量加样存在误差	进一步稀释低浓度模板后加入大体积
与其他qPCR试剂相比, T _m 值不同	不同厂家的buffer使用了不同的盐离子浓度	内参基因和目的基因使用同一品牌试剂即可进行相对定量, T _m 绝对值没有比较参考价值的。
是否需要冰上操作		本品含有的热启动Taq DNA Polymerase可避免室温下引物的非特异性延伸, 可以常温配置体系
是否兼容快速程序		扩增子在70-200bp时可使用快速程序, 根据不同仪器可以节省40%-60%的时间, 扩增子>200bp时, 请使用标准程序。