

ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix (High ROX Premixed)

Q341-01/02/03

Version 6.1



Vazyme biotech co., Ltd.

产品简介

本产品是使用SYBR® Green I 嵌合荧光法进行qPCR反应的专用预混液。核心组分Champagne™ Taq DNA Polymerase为一种新型的抗体法热启动DNA聚合酶，具有特异性强、检测灵敏度高等诸多优点，配以针对qPCR优化的最适Buffer以及专利特异性促进因子Exactor™，非常适合于进行高特异性、高灵敏度的qPCR反应。本产品中含有qPCR反应最适浓度SYBR® Green I，是一种2 × 预混合试剂，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因定量准确、重复性好、可信度高。

产品组成

组 分	Q341-01 (125 rxn / 20 µl reaction)	Q341-02 (500 rxn / 20 µl reaction)	Q341-03 (2,500 rxn / 20 µl reaction)
2 × ChamQ SYBR qPCR Master Mix (High ROX Premixed) ^a	1.25 ml	1.25 ml × 4	Q341-02 × 5

a. 包含dNTP, Mg²⁺, Champagne Taq DNA Polymerase, SYBR Green I, ROX Reference Dye 1 等。

适用机型

本产品中预混了用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差的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。

储存条件

长期储存应置于-20℃避光；Master Mix解冻后可于4℃避光条件下稳定存放6个月。

质量控制

纯度检测：所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶、核酸残留。

功能检测：以100 ng HeLa细胞总RNA逆转录产物的数十倍稀释梯度为模板，扩增B2M基因。扩增效率在0.95-1.05之间，10⁻⁵稀释梯度Ct值不大于35。

应用实例

1. 在qPCR管中配制如下混合液

2 × ChamQ SYBR qPCR Master Mix (High ROX Premixed)	10.0 µl
Primer1 (10 µM)	0.4 µl
Primer2 (10 µM)	0.4 µl
Template DNA/cDNA	x µl
ddH ₂ O	To 20.0 µl

注：反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

- 一般来说反应体系中引物终浓度为0.2 µM即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度0.1-1.0 µM范围内调整引物浓度。
- qPCR灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后(如稀释至2-5 µl/样本)加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。
- 扩增产物长度越短扩增效率越高，推荐扩增产物长度为80 bp-150 bp。
- 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。

2. 按下列条件进行qPCR反应

Stage 1	预变性 ¹	Reps: 1	95 °C	30 sec
Stage 2	循环反应 ²	Reps: 40	95 °C	10 sec
			60 °C	30 sec
			95 °C	15 sec
Stage 3	融解曲线 ³	Reps: 1	60 °C	60 sec
			95 °C	15 sec

¹ 该预变性条件适合绝大多数扩增反应，如模板结构复杂，可将预变性时间延长至3 min以提高预变性效果。

² 对于300 bp以内的扩增子而言，延伸时间设置为30 sec即可；超过300 bp的扩增子，推荐延长延伸时间至60 sec。

³ 仪器类型不同，融解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

实验操作注意事项

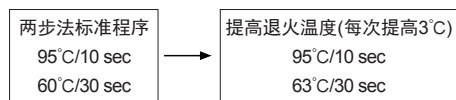
- 1). Master Mix应置于-20°C避光条件下长期保存, 避免反复冻融; 如短期内需反复使用, 解冻后可置于4°C避光条件下暂存, 有效期6个月。
- 2). Master Mix解冻后可能出现些许白色沉淀, 置于室温放置片刻并上下颠倒沉淀即会溶解。请确认沉淀完全溶解, 并充分混匀后使用。

反应体系优化方案

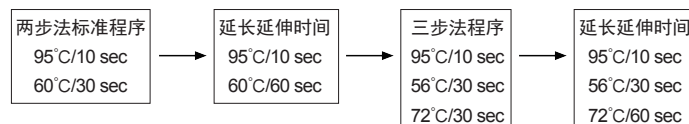
优秀的反应体系应具备一些特征, 按照重要程度从高到低排列依次为: **融解曲线单峰(扩增特异性)**、**扩增效率e值接近100%(扩增效率)**、**Ct值小(扩增效率)**。如使用默认反应条件反应性能不佳时, 可根据下述方案进行反应条件优化。选择最适实验条件时需综合考虑扩增特异性和扩增效率两方面指标。

- 1). **引物浓度与反应性能之间的关系**: 当引物终浓度在0.1 μM - 1.0 μM范围之间变化时, 引物浓度越高, 扩增特异性越差, 但扩增效率越高。
- 2). **扩增程序与反应性能之间的关系**:

需**提高扩增特异性**, 可使用两步法推荐程序或提高退火温度:



需**提高扩增效率**, 可延长两步法程序延伸时间或使用三步法程序:



- 3). **预变性时间**: 默认预变性条件95°C/30 sec能使绝大多数模板充分变性; 如怀疑模板复杂程度高变性不充分, 可将预变性时间延长至3 min以提高预变性效果。

引物设计注意事项

- 1). 扩增产物长度80 bp-150 bp为佳。重要!
- 2). 引物长度17 bp-25 bp为佳。引物太长或太短都会干扰定量结果的准确性。
- 3). 引物的3'端应尽量避免高GC或高AT含量区域。
- 4). 引物3'端最后一个碱基最好为G或者C, 避免使用T。
- 5). 正向引物和反向引物的Tm值相差不超过1°C为佳。Tm值调整至60°C-65°C度为佳(引物Tm值推荐使用Primer 5进行计算)。
- 6). 引物的GC含量控制在40%-60%之间为好, 最佳为45%-55%之间。
- 7). 引物A、G、C、T整体分布要尽量均匀, 避免使用GC或者AT含量高的区域。
- 8). 避开引物内部或者两条引物之间有5个碱基以上的互补序列。二条引物之间的3'端避开有3个碱基以上的互补序列。
- 9). 引物设计完毕请使用NCBI BLAST功能检索引物特异性, 以避免非特异性扩增产生。

常见问题与解决方案

1). 扩增曲线形状异常

- a). 扩增曲线不光滑: 信号太弱, 经系统矫正后产生, 提高模板浓度重复试验。
- b). 扩增曲线断裂或下滑: 模板浓度较高, 基线的终点值大于Ct值。减小基线终点(Ct值-4), 重新分析数据。
- c). 个别扩增曲线突然骤降: 反应管内留有气泡。处理样本时要注意离心、进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

2). 反应结束无扩增曲线出现

- a). 反应循环数不够: 一般设置循环数为40, 但需要注意的是过多的循环会增加过多的背景信号, 降低数据可信度。
- b). 确认程序中是否设置了信号采集步骤: 两部法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段; 三步法扩增程序应当将信号采集设置在72°C延伸阶段。
- c). 确认引物是否降解: 长时间未用的引物应先通过PAGE电泳检测完整性, 以排除其降解的可能性。
- d). 模板浓度太低: 减少稀释度重复试验, 一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- e). 模板降解: 重新制备模板, 重复试验。

3). Ct值出现太晚

- a). 扩增效率极低: 优化反应条件, 尝试三步法扩增程序, 或者重新设计引物。
- b). 模板浓度太低: 减少稀释度重复试验, 一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- c). 模板降解: 重新制备模板, 重复试验。
- d). PCR产物太长: 推荐PCR产物长度为80 bp-150 bp。
- e). 体系中存在PCR抑制剂: 一般为模板带入, 加大模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验。

4). 阴性对照也出现明显扩增

- a). 反应体系污染: 更换新的Mix、水、引物重复试验。反应体系在超净工作台上配制, 减少气溶胶污染。
- b). 引物二聚体的出现: 一般在35循环以后阴性对照出现扩增属正常情况, 可配合融解曲线进行分析。

5). 绝对定量时标准曲线线性关系不佳

- a). 加样误差: 提高模板稀释倍数, 提高加样体积。
- b). 标准品降解: 重新制备标准品, 重复试验。
- c). 模板浓度太高: 提高模板稀释倍数。

6). 融解曲线出现多峰

- a). 引物设计不优化: 根据设计原则设计新的引物。
- b). 引物浓度太高: 适当降低引物浓度。
- c). cDNA模板带有基因组污染: 重新制备cDNA模板。

7). 实验重复性差

- a). 加样体积失准: 使用性能较好的移液枪, 扩大反应体积, 将模板做高倍稀释, 以大体积加入反应体系中。
- b). 定量PCR仪不同位置温度控制不一致: 定期校准仪器。
- c). 模板浓度太低: 模板浓度越低, 重复性越差, 减少模板稀释度或提高加样体积。