

YALEPIC® UR 高灵敏 qPCR 预混液 (染料法)

YALEPIC® UR SYBR Green qPCR MasterMix

产品货号: YQ51001

产品保存及运输条件: -20℃ 避光保存。

产品概述

YALEPIC® UR SYBR Green qPCR MasterMix 是基于 SYBR Green I 染料法的 qPCR 的预混体系, 本产品内含抗体法制备的热启动 DNA 聚合酶, 搭配针对低拷贝模板优化的缓冲液, 可以有效抑制非特异性扩增, 极大增加 qPCR 扩增效率以及检测灵敏度, 适用于高 GC 含量模板的扩增。可应用于 SNP 分型, 基因表达分析, 药物靶点验证及疾病相关研究等。本产品浓度为 2×, 使用时只需加入模板、引物、ROX Reference Dye (根据 qPCR 仪选择)、ddH₂O 即可进行反应。

产品组成

序号	组分	规格
①	2× YALEPIC® UR SYBR Green qPCR MasterMix	5 × 1 ml
②	50× ROX Reference Dye I	200 μl
③	50× ROX Reference Dye II	200 μl
④	Nuclease-Free ddH ₂ O	5 ml

*可参照下表选择添加 ROX Reference Dye

无需添加 ROX Reference Dye	Bio-Rad iCycler iQ5;CFX96,CFX384,iO,i05,Myio,Opticon,Chromo4; Qiagen Corbett Rotor-Gene O,Rotor-Gene 3000,Rotor-Gene 6000; Eppendorf Mastercycler ep realplex,realplex 2 s; Roche Applied Science LightCycler 480; Roche LightCyler 96; Thermo Scientific PikoReal Cyclyer; Cepheid SmartCycler;illumina Eco qPCR;Takara TP-800.
添加 ROX Reference Dye I (终浓度为 1×)	Applied Biosystems 7000,7300,7700,7900,7900HT,7900HT Fast;ABI Step One/Step One Plus; Eppendorf
添加 ROX Reference Dye II (终浓度为 1×)	Applied Biosystems 7500,7500 Fast,ViiA7;Stratagene MX3000P,MX3005P, MX4000;QuantStudio 1 Plus System;QuantStudio® 3/5 System ; QuantStudio® 6 /7Flex System; Corbett Rotor Gene 3000 等

自备试剂/耗材/仪器

Nuclease-free PCR 板、八联排管、移液吸头等耗材；qPCR 仪器等。

实验流程

1. 使用试剂前确保彻底融化并混匀，加入反应体系的其他组分应充分混匀；
2. 计算所加各组分的体积（参考下面表格），并小心吸取准确体积到 PCR 反应管内；

组分	用量 (20 μ l 体系)
2 $\times$ YALEPIC [®] UR SYBR Green qPCR MasterMix	10 μ l
10 μ M Forward Primer	0.4 μ l
10 μ M Reverse Primer	0.4 μ l
50 $\times$ ROX Reference Dye (optional)	0.4 μ l
Template	As required
Nuclease-free ddH ₂ O	Up to 20 μ l

注：引物终浓度为 0.2 μ M 即可得到较好的扩增效果。当反应性能较差时，可以在终浓度 0.1 ~ 0.5 μ M 范围内进行调整；Template 使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。

3. 盖好 PCR 管盖，瞬时离心。
4. qPCR 反应程序推荐（两步法）

95°C	3 min	1 cycle	预变性
95°C	5 sec	40 cycles	变性
	30 sec		退火/延伸
60°C			
溶解曲线			仪器默认设置

对于 ABI 仪器，荧光信号采集步骤（三步法中可以是退火或是延伸步骤）的时间如下：

使用 ABI 7700/7900 时，采集时间设定为 30 s；

使用 ABI 7000/7300 时，采集时间设定为 31 s；

使用 ABI 7500 时，采集时间设定为 34 s。

注：

1. 预变性时间可设置为 1 min，若模板 GC 含量较高可适当延长预变性时间至 2 min。
2. 初次可使用 60°C，20 s 预实验，最低退火延伸时间在不同仪器上会有不同，或根据引物和探针的 T_m 值确定。
3. Ct 值较高，并不一定反映扩增效率低，需要通过标准曲线判断。

注意事项

1. 使用前请颠倒混匀预混液，瞬时离心后即可使用；
2. 如有沉淀析出，可在室温短时间放置后，涡旋混匀，完全溶解后使用；
3. 配制反应体系时应尽量避免强光照射；
4. 尽量避免反复冻融，以免酶活下降。

常见问题及解决方案

问题	解决方案
阴性对照中有信号产生	1.模板或试剂被核酸污染：在进行 PCR 反应前采取标准的预防措施，以降低污染风险； 2.产生引物二聚体：配合融解曲线进行分析。
融解曲线出现多个峰	1.存在引物二聚体或其他特殊结构：根据设计原则设计合成新的引物； 2.引物浓度太高：适当降低引物浓度； 3.cDNA 模板带有基因组污染：重新制备 cDNA 模板。
定量 PCR 无扩增曲线	1.反应循环数不够：一般设置循环数为 40； 2.确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段； 3.确认引物是否降解：长时间未使用的引物可能发生降解，合成新的引物，重复实验； 4.模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品按最高浓度进行检测； 5.模板降解：重新制备模板，重复实验。
定量 PCR 扩增曲线不平滑	1.信号太弱：提高模板浓度重复实验； 2.ROX 类型使用错误：确认所用 ROX 与机型是否匹配； 3.定量 PCR 反应过程中体积变化：PCR 管未盖严导致反应体系蒸发。
Ct 值出现太晚	1.扩增效率低：优化反应条件，或者重新设计合成引物； 2.模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品按最高浓度进行检测； 3.模板降解：重新制备模板，重复实验； 4.PCR 产物太长：推荐 PCR 产物长度为 80 ~ 150 bp； 5.反应体系中存在 PCR 抑制剂：一般为模板引入，加大模板稀释倍数或重新制备模板。
实验重复性差	1.加样体积不准确：使用准确的移液器；增加模板稀释度，以大体积加入反应体系中； 2.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； 3.定量 PCR 反应过程中体积变化：PCR 管未盖严导致反应体系蒸发。

本产品仅供研究使用，请勿用于临床诊断