



2×RealStar Fast Pro SYBR qPCR Mix (UNG)

2×RealStar Fast Pro 染料法 qPCR 预混液 (UNG)

版本号: V231101

货号: A402
保存: -20°C避光
运输: 低温

货号	规格
A402-01	1.1 ml
A402-05	1.1 ml×5
A402-10	1.1 ml×10

【产品概述】

本产品是升级版 SYBR Green I 嵌合荧光法 qPCR 反应预混液 (UNG)。核心组分为经过升级改造的抗体法修饰的新一代热启动 *Taq* 聚合酶, 其搭配优化的 qPCR Buffer, 具有扩增速度快, 灵敏度高, 特异性强等特点, 适用于基因组 DNA 和 cDNA 模板的扩增, 对不同 GC 含量 (30%-75%) 基因扩增均有非常高的扩增效率。另外使用 dUTP/热敏 UNG 防污染系统, 可有效防止 PCR 产物气溶胶污染, 热敏 UNG 在加样过程中便可起效, 在 PCR 预变性环节迅速失活, 保证 PCR 扩增效率不受影响。本产品为 2×浓度 qPCR 预混液, 使用时只需加入模板、引物、水和 ROX (根据机型选择 ROX Reference Dye, 以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差), 使其工作浓度为 1×, 即可进行反应。

【产品组分】

组分货号	组分名称	A402-01	A402-05	A402-10
ZA402-101	2×RealStar Fast Pro SYBR qPCR Mix (UNG)	1.1 ml	1.1 ml×5	1.1 ml×10
ZA320-101	High ROX Reference Dye	44 µl	220 µl	440 µl
ZA321-101	Low ROX Reference Dye	44 µl	220 µl	440 µl

注: 不同仪器所需 ROX Reference Dye 不同:

需加 High ROX Reference Dye (50×)的机型: ABI Prism7000/7300/7700/7900HT 和 ABI StepOne /ABI StepOne Plus。

需加 Low ROX Reference Dye (50×)的机型: ABI Prism7500 /7500 Fast, MJ Research Chromo4, Opticon (II), Corbett Rotor Gene 3000。

无需加 ROX Reference Dye 的机型: Thermal Cycler Dice Real Time System, LightCycler, Smart Cycler System, Corbett Rotor-gene 6000, Agilent Technologies Mx3000P 等荧光定量 PCR 仪。

【保存条件】

-20°C避光保存, 保质期 24 个月, 避免反复冻融。如果经常使用, 可置于 4°C保存至少 3 个月。

【注意事项】

- 使用前请上下颠倒轻轻混匀, 尽量避免起泡, 并经短暂离心后使用。
- 尽可能减少 2×RealStar Fast Pro SYBR qPCR Mix (UNG)在光下的曝露时间, 长时间的曝光可导致荧光信号减弱。
- 反应液的配制、分装请一定使用无污染的枪头、Microtube 等, 尽量避免交叉污染。本品不能用于杂交探针法。

【使用方法】

用户需自备的试剂: cDNA 或 DNA 模板、引物。(请按照不同品牌荧光定量 PCR 仪的使用说明书要求进行实验操作。)

操作示例: 分别以 20 µl和 50 µl PCR反应体系为例:

- qPCR 反应体系的建立:

组分	20 µl体系	50 µl体系
DNA模板 ^a	1 µl	1 µl
正向引物 (10 µM) ^b	0.4 µl	1 µl
反向引物 (10 µM) ^b	0.4 µl	1 µl
2×RealStar Fast Pro SYBR qPCR Mix (UNG)	10 µl	25 µl
High/Low ROX Reference Dye ^c	0.4 µl	1 µl
Sterile Water	补足至 20 µl	补足至 50 µl

^a模板量: 10-100 ng基因组DNA, 或 1-10 ng cDNA为参照, 因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数和GC含量不同, 可对模板进行梯度稀



释，以确定最佳的模板使用量。另外Two Step RT-PCR反应的cDNA（RT反应液）作为模板时的添加量不要超过PCR反应液总体积的10%。

^b引物：通常引物浓度以0.2 μM可以得到较好结果，可以终浓度0.1-1.0 μM作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。为了获得理想的qPCR的效果，扩增片段的长度建议为80-300 bp。

^c不同仪器所需 ROX Reference Dye 不同，或需要添加或不需要添加，请根据仪器说明进行操作。

2. qPCR 反应条件的设置：

注：以下举例为常规qPCR反应系统，仅供参考。实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异，需根据模板、引物、目的片段的特点设定最佳反应条件，并根据比例放大或缩小反应体系。

标准qPCR反应程序：

流程	温度	时间	循环数
预变性	95°C	2 min ^d	
变性	95°C	15 s	40
退火/延伸	60°C ^e	30 s ^f	

溶解曲线（仪器自动设置）

^d在预变性时，通常设定为95°C 2 min，复杂或高GC模板适当延长时间至5 min。

^e对于复杂模板、高GC含量的扩增子，建议增加退火和延伸温度至68°C。

^f对于≥350 bp或者高GC含量的扩增子，建议增加延伸时间至40 s或更长时间。

快速qPCR反应程序：

注：初次扩增建议采用标准反应程序，快速反应程序可能会损失部分扩增产量需验证后使用。

流程	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 s	
变性	95°C	5 s	40
退火/延伸 ^e	60°C ^e	10 s ^f	

溶解曲线（仪器自动设置）

^e对于复杂模板、高GC含量的扩增子，建议增加退火和延伸温度至68°C。

^f延伸时间≤10 s，可完成至少300 bp的扩增，满足绝大多数的qPCR实验。对于≥350 bp或者高GC含量的扩增子，建议增加延伸时间至40 s或更长时间。

3. 在相应的 real time PCR 仪器上完成实验，并分析结果。

【常见问题与解决方法】

1. 扩增曲线不好或扩增效率低：

- 1) 模板质量差或浓度低，可提高模板的纯度和浓度；引物设计不合理，重新设计引物。
- 2) 扩增条件不理想，可通过延长延伸时间，降低退火温度改善。
- 3) 如 ROX 加量过高会导致修正后荧光值低，检查 ROX 加量是否正确。

2. 溶解曲线不正常：

- 1) 扩增非特异，溶解曲线不是单峰，可降低引物浓度，也可提高退火温度提高扩增特异性。
- 2) 对于高 GC 复杂模板，部分仪器（如 ABI 7500 仪器）会发生溶解曲线不完整的情况，将溶解温度的上限设定为 99°C 可解决该问题。

3. 扩增重复性差：

- 1) 模板纯度低，抑制 PCR 反应，导致实验的重复性差，可降低模板浓度或将模板纯化后再使用。
- 2) 如使用快速扩增程序出现扩增重复性差，由于部分仪器硬件或控制用的软件原因，退火延伸时间无法设定为 30 s，请根据仪器的使用说明书，合理设置退火与延伸时间。

4. 扩增曲线呈锯齿状：

- 1) 部分仪器延伸时间过短时，荧光测定不能充分有效完成，导致扩增曲线呈锯齿状，延长延伸时间可得到改善。
- 2) 反应液体积太小，少于仪器的标准规定的体积进行反应时，会增大荧光测定值的误差，此时应增加反应体积。

5. 基线上飘：

- 1) 模板浓度过高，从而无法计算出正确的 Ct 值，请适当降低模板浓度再进行反应。
- 2) 当模板纯度较低时，所含杂质会抑制 PCR 反应。请降低模板浓度，或将其纯化后再进行使用。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。