



## 2×RealStar Fast Pro SYBR qPCR Mix

### 2×RealStar Fast Pro 染料法 qPCR 预混液

版本号: V240701

货号: A401  
保存: -20°C避光  
运输: 低温

货号	规格
A401-01	1.1 ml
A401-05	1.1 ml×5
A401-10	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。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。

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	A401-01	A401-05	A401-10
ZA401-101	2×RealStar Fast Pro SYBR qPCR Mix	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 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：

##### 1. qPCR 反应体系的建立：

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

<sup>a</sup>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%。

<sup>b</sup>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. PCR 反应条件的设置：

### 两步法 PCR 扩增程序

流程	温度	时间（参考范围）	循环数
预变性	95°C	2 min (30 s-5 min) <sup>d</sup>	
变性	95°C	10 s (3 s-15 s) <sup>e</sup>	40
退火/延伸	60°C <sup>f</sup>	30 s (10 s-40 s) <sup>g</sup>	

#### 溶解曲线（仪器自动设置）

<sup>d</sup> 预变性时间：标准程序选择 2 min，适合大多数模板；快速程序最短可选择 30 s；复杂或高 GC 模板，可适当延长预变性时间至 5 min。

<sup>e</sup> 变性时间：标准程序 10 s；快速程序最短可选择 3 s；

<sup>f</sup> 退火/延伸温度：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。

<sup>g</sup> 退火/延伸时间：标准程序 30 s，可以满足绝大多数的 qPCR 实验；对 200 bp 以内的扩增子，延伸时间最短可设置为 10 s；对于超过 350 bp 或者高 GC 含量的扩增子，建议增加延伸时间至 40 s 或者采用三步法以提高扩增效率。

### 三步法 PCR 扩增程序

流程	温度	时间	循环数
预变性	95°C	2 min	
变性	95°C	15 s	40
退火	60°C	15-30 s	
延伸	72°C	30 s	

#### 溶解曲线（仪器自动设置）

注：以上举例为常规 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。

## 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】

- 扩增曲线不好或扩增效率低：
  - 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。
  - 扩增条件不理想，可通过延长延伸时间，降低退火温度改善。
  - 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。
- 溶解曲线不正常：
  - 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。
  - 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。
- 扩增重复性差：
  - 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。
  - 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。
- 扩增曲线呈锯齿状：
  - 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。
  - 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。
- 基线上飘：
  - 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。
  - 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。