

2× HotStart SYBR qPCR Master Mix

Cat. No. M4QS04 / M4QS05 / M4QS06

【产品概述】

2× HotStart SYBR qPCR Master Mix 是专用于染料法（SYBR Green I）的实时荧光定量 PCR 预混体系。本产品使用的抗体法热启动 DNA 聚合酶 HotStart Taq DNA Polymerase 具有特异性强、检测灵敏度高等诸多优点，搭配特殊优化的缓冲体系可以确保极高的 DNA 扩增效率，适合于进行高特异性、高灵敏度的 qPCR 反应，并在广泛的定量区间获得良好的扩增曲线。预混液中的荧光染料 SYBR Green I 可以特异性结合于双链 DNA 的小沟区域，被合适波长激发时发出荧光，因而本产品可用于不同靶序列的检测而无需合成特异性标记探针。产品主要用于 DNA 靶序列和 RNA 反转录后的 cDNA 靶序列的扩增检测；同时可以进行熔解曲线分析，检测引物特异性等。

本产品提供不含荧光校准染料（M4QS04）、含 High ROX（M4QS05）和含 Low ROX（M4QS06）校准荧光染料的三个版本。含 ROX 染料版本可以校正荧光定量 PCR 仪的孔间荧光信号误差，适用于以 ROX 作为校正染料的荧光定量 PCR 仪。

【产品组分】

● 2× HotStart SYBR qPCR Master Mix

组分	M4QS04-01 (100 rxns)	M4QS04-02 (500 rxns)	M4QS04-03 (2500 rxns)
2× HotStart SYBR qPCR Master Mix	1 mL	5×1 mL	5×M4QS04-02

● 2× HotStart SYBR qPCR Master Mix (High ROX)

组分	M4QS05-01 (100 rxns)	M4QS05-02 (500 rxns)	M4QS05-03 (2500 rxns)
2× HotStart SYBR qPCR Master Mix (High ROX)	1 mL	5×1 mL	5×M4QS05-02

本产品 ROX 含量较高，适用于 Applied Biosystems 5700、7000、7300、7700、7900、7900HT、7900HT Fast、StepOne、StepOne Plus 以及其他需要添加高浓度 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪。



● 2× HotStart SYBR qPCR Master Mix (Low ROX)

组分	M4QS06-01 (100 rxns)	M4QS06-02 (500 rxns)	M4QS06-03 (2500 rxns)
2× HotStart SYBR qPCR Master Mix (Low ROX)	1 mL	5×1 mL	5×M4QS06-02

本产品 ROX 含量较低，适用于 Applied Biosystems 7500、Stratagene Mx3000、3005、4000 等仪器。

【储存和运输】

干冰或冰上运输，-20℃避光保存；避免反复冻融。

【实验操作】

1. 推荐的反应体系

组分	推荐用量	推荐终浓度
2× HotStart SYBR qPCR Master Mix	10 μL	1×
Forward Primer (10 μM)	0.4 μL	0.1 - 1 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μL	0.1 - 1 μM
Template DNA	Variable	-
ddH ₂ O	to 20 μL	-

注：可根据不同模板类型对投入的体积进行适当调整。

2. 两步法扩增程序

步骤	温度	时间	荧光信号	循环数
Pre-denaturation	95℃	3 min		1
Denaturation	95℃	10s		40
Annealing/Extension	55-65℃	5-20s ¹	采集荧光 ²	
Melting curve	【可选步骤】按仪器推荐程序即可			

1 可根据目的片段长度调整扩增时间。

2 采集 SYBR Green I 荧光信号。



【常见问题与解决方案】

常见问题		解决方案
A：扩增曲线异常	扩增曲线不光滑	进行系统矫正；提高模板浓度
	扩增曲线断裂或下滑	模板浓度较高，可降低模板浓度或分析时设定较少的基线循环数
	个别扩增曲线骤降	反应管内留有气泡，样本上机前离心
	扩增曲线呈锯齿状且不连续	ROX 类型使用错误，确认所用 ROX 与机型是否匹配
B：反应结束无扩增曲线	循环数不够	一般建议设置循环数为 40，过多循环数增加背景信号，降低数据可信度
	程序中未正确设置信号采集	两步法一般在退火/延伸阶段采集信号；三步法在延伸阶段采集信号；设置正确的荧光类型
	引物降解	PAGE 电泳检测引物完整性
	模板浓度低	未知样品从高浓度做起，降低稀释度
	模板降解	重新制备模板
C：重复性差	加样不准确	更换移液枪；扩大反应体积
	qPCR 预混液未混匀	使用前充分解冻并混匀预混液
D：Ct 值过高	PCR 产物过长	推荐 PCR 产物长度 80-150bp
	模板降解	重新制备模板
	扩增效率低	优化反应条件，尝试三步法扩增；重新设计引物
	反应体系中存在 PCR 反应抑制剂	若为模板带入，可加大模板稀释倍数或重新制备模板
	模板浓度低	减少稀释倍数，重复实验
E：标准曲线线性关系不佳	加样误差	加大模板稀释倍数，提高加样体积
	标准品降解	重新制样，重复实验
	模板浓度太高	增加模板稀释倍数





**SERVE SCIENCE
SEE THE FUTURE**