



# Magic SYBR Green qPCR Mix

Magicbio # M223



## 产品描述

本制品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行Real Time PCR的专用试剂，将热启动Taq DNA聚合酶、dNTP、SYBR Green I等试剂预混成即用的2x Mix，可对目标cDNA进行快速并具有高特异性的定量检测。本产品采用化学修饰的Hot Start Taq DNA聚合酶，在 50 °C以下无活性，只有 95 °C条件下加热后才能完全恢复酶的活力，最大限度减少非特异性扩增产物的产生，提高荧光定量PCR反应的精确性。该试剂盒独特的反应缓冲液，可在宽范围中得到良好的扩增结果、检测灵敏度更高、信号更强。

## 产品组成

| 组分                        | M2231 (20μl体系*500次) | M2232 (20μl体系*500次*10) |
|---------------------------|---------------------|------------------------|
| Magic SYBR Green qPCR Mix | 5ml                 | 5ml*10                 |
| 50X ROX Reference Dye     | 1ml                 | 1ml*10                 |

储存条件：-20℃避光保存；解冻后可于2~8 °C避光保存6个月

## 操作方法

### 1. 建立反应体系

将所有试剂融解，上下颠倒轻轻均匀混合，避免产生气泡，短暂离心后按照下表配制反应液。建议置于冰上进行。

| 组分                        | 20μl体系     | 终浓度        |
|---------------------------|------------|------------|
| Magic SYBR Green qPCR Mix | 10μl       | 1×         |
| Primer F(10μM)*           | 0.4~0.8 μl | 0.2~0.4 μM |
| Primer R(10μM)*           | 0.4~0.8 μl | 0.2~0.4 μM |
| 50× ROX Reference Dye**   | -          | -          |
| Template DNA              | -          | -          |
| Nuclease-Free Water       | To 20μl    | -          |

\*一般反应体系中引物终浓度为0.2μM即可得到较好扩增效果，当反应性能较差时，可在终浓度0.2~0.4 μM范围内调整引物浓度。

\*\* 使用ABI PRISM 7000/7300/7700/7900/StepOne等仪器时，ROX Reference Dye终浓度应为5×(即20μl体系加2μl 50× ROX)；使用ABI 7500/7500 Fast/Stratagene MX3000/MX3005P/MX4000等仪器时，ROX Reference Dye终浓度应为1×(即20μl体系加0.4μl 50× ROX)；使用Bio-Rad/Eppendorf等品牌仪器时，无需加ROX Reference Dye。

### 2. 加样后处理

盖上或密封反应管/PCR板，轻轻混匀。短暂离心，确保所有组分都在管/板底。

### 3. 设置qPCR反应程序

建议采用两步法反应程序：

| 温度     | 时间   |            |
|--------|------|------------|
| 95°C   | 5min |            |
| 95°C   | 10s  | } 40 cycle |
| 60°C   | 30s  |            |
| 熔解曲线分析 |      |            |

若模板量较低等因素造成扩增效率不佳时，可采用三步法反应程序：

| 温度     | 时间   |            |
|--------|------|------------|
| 95℃    | 5min |            |
| 95℃    | 10s  | } 40 cycle |
| 55-60℃ | 30s  |            |
| 72℃    | 30s  |            |
| 熔解曲线分析 |      |            |

#### 4. 上机

将反应体系置于荧光定量 PCR 仪中，运行程序收集数据并分析结果。

## 注意事项

1. 本制品所含SYBR Green I强光下易分解，使用时避免强光长时间照射。
2. 建议冰上配制PCR反应液，可提高扩增特异性，减少背景。
3. 若模板类型为未稀释的cDNA原液，使用体积不应超过qPCR反应总体积的1/10。

## 常见问题及解决方案

#### 1. 反应结束无扩增曲线出现

反应循环数不够：一般设置循环数40，但过多的循环会增加背景信号，降低数据可信度。

模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样本先从最高浓度做起。

确认程序中设置了信号采集步骤：两步法程序一般退火延伸阶段采集信号；三步法程序设置在72℃。

确认模板、引物无降解。

#### 2. Ct值出现太晚

扩增效率低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或重新设计合成引物。

模板浓度低：减少稀释度重复实验。

PCR产物太长或GC比较高：推荐PCR产物长度为80-150bp，GC比45-55%。

#### 3. 熔解曲线出现多峰

引物设计不合适：依据设计原则重新设计引物。

PCR退火温度低：提高退火温度优化反应条件。

#### 4. 阴性对照出现明显扩增

反应体系污染：更换新的Mix、水、引物，采取必要的防污染策略。

引物二聚体出现：配合熔解曲线进行分析。

#### 5. 实验重复性差

加样体积不准：使用性能较好的移液器；将模板稀释后以大体积加入反应体系。

仪器问题：定期校准仪器。

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。

