

## MonAmp™ TaqMan qPCR Mix (None/Low/High ROX)

REF: MQ30101/ MQ30201/ MQ30301

### 储运条件

长期保存请于 -20°C 避光保存, Mix 融解后可在 4°C 避光条件下稳定存放一个月, 尽量避免反复冻融。

### 产品组成

组分 / 规格	MQ30101S	MQ30201S	MQ30301S
MonAmp™ Taqman qPCR Mix (None ROX)	5×1 ml	—	—
MonAmp™ Taqman qPCR Mix (Low ROX)	—	5×1 ml	—
MonAmp™ Taqman qPCR Mix (High ROX)	—	—	5×1 ml
Nuclease-Free Water	5×1 ml	5×1 ml	5×1 ml

### 产品简介

MonAmp™ Taqman qPCR Mix 是 TaqMan® 探针法专用的 qPCR 试剂, 为 2× 预混液, 包含除探针、引物和 DNA 样品以外的所有 qPCR 组分, 可减少操作步骤, 缩短加样时间, 降低污染几率。其核心组分是经抗体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶, 可以有效抑制非特异性扩增, 配合优化的反应体系, 可用于基于 TaqMan® 探针法的多重 qPCR 检测。

### 使用方法

#### 1. 适配机型

产品	适用机型
MQ30101 (None ROX)	莫纳质选 q225、q225MX; Bio-Rad CFX 全系列; Roche LightCycler™ 系列; Eppendorf Mastercycler® ep realplex 系列; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® 系列; Takara Thermal Cycler Dice; analytikjena qTOWER 系列等
MQ30201 (Low ROX)	ABI 7500/7500 Fast, ABI ViiA 7™; ABI QuantStudio™ 系列; Stratagene Mx3000P®/3005P™/4000™
MQ30301 (High ROX)	ABI 7000/7300/7700/7900 HT/7900 HT Fast, StepOne™, StepOne Plus™ 等

#### 2. 使用注意

- ① 因 MQ30201 和 MQ30301 中预混了 ROX 染料, 其保存和反应体系配制过程应避免强光照射;
- ② 使用前上下颠倒轻轻混匀 Mix, 请勿涡旋振荡混匀, 避免产生过多气泡。

#### 3. 建议的 qPCR 反应体系

试剂	使用量	终浓度
MonAmp™ Taqman qPCR Mix	10 μl	1×
正向引物 (10 μM) <sup>a</sup>	0.4 μl	0.2 μM
反向引物 (10 μM) <sup>a</sup>	0.4 μl	0.2 μM
TaqMan 探针 <sup>b</sup>	1 μl	0.25 μM
DNA 模板 <sup>c</sup>	X μl	10~200 ng/20 μl
Nuclease-Free Water	To 20 μl	

- 通常推荐的引物终浓度为 0.2 μM, 反应效果不佳时可在 0.1~1 μM 范围内进行调整;
- 探针的终浓度推荐为 0.25 μM, 效果不佳时可以在 0.1~1 μM 范围内进行调整;
- 推荐模板加样量为 1~2 μl, 如模板类型为未稀释 cDNA 原液, 模板添加量不应超过总反应体系的 10%。不同种类 DNA 模板中含有的靶基因拷贝数目不同, 必要时可进行梯度稀释, 以确定最佳的 DNA 模板添加量。

#### 4. qPCR 反应程序 (可根据机型适当调整)

##### 两步法

步骤	温度	时间
预变性	95 °C	2 min
变性	95 °C	15 sec
退火 & 延伸 <sup>a</sup>	60 °C	30 sec

← 40 Cycles

- 根据引物的 T<sub>m</sub> 值进行退火 & 延伸温度的设定; 若扩增片段在 200 bp 以内, 退火 & 延伸时间可以设置为 15 sec; 此外, 退火 & 延伸时间的设置还需根据您使用的 qPCR 仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整。

☎ 400-820-2141

莫纳生物科技有限公司  
Monad Biotech Co., Ltd.

Tel: +86-(0)21-64868889  
Fax: +86-(0)21-64868669

E-mail: support@monadbiotech.com  
www.monadbiotech.com

最终解释权所有 © 莫纳生物科技有限公司, 保留一切权利



Simply Discover More

## 5. 引物设计原则

- ① 扩增产物长度建议控制在 80~200 bp；
- ② 引物长度为 18~25 bp；
- ③ 正向引物和反向引物的 Tm 值相差不超过 1°C 为佳，Tm 值控制在 58~62°C 为佳；
- ④ 引物的 GC 含量控制在 40%~60% 之间；
- ⑤ 引物 A、G、C、T 整体分布尽量要均匀，避开 T/C 或者 A/G 的连续结构（特别是 3' 端），引物 3' 端最后一个碱基最好为 G 或者 C；
- ⑥ 正向或者反向引物应尽量接近探针序列，但是不能和探针序列有重合区域；
- ⑦ 避开引物内部或者两条引物之间的互补序列；
- ⑧ 使用 NCBI BLAST 功能检索确认引物的特异性。

## 6. 探针设计原则

- ① 探针序列应尽量接近正向或反向引物，但不能与之有重合区域；
- ② 探针长度建议介于 25~35 bp；
- ③ GC 含量介于 30~80%，应避免连续相同的碱基出现，特别是避开连续 4 个 G；
- ④ 探针 5' 端应避免使用碱基 G；
- ⑤ 探针的退火温度应为 68~72°C；
- ⑥ 如果序列中包含多态性位点，应使其位于探针序列中间。

## 常见问题

问题描述	可能原因	解决办法
扩增曲线不光滑	荧光信号太弱，经系统校正后产生	确保染料、引物、探针和模板未降解；更换荧光信号收集更好的 qPCR 耗材
扩增曲线断裂或下滑	模板浓度较高，基线的终点值大于 Cq 值	减小基线终点 (Cq 值 -4)，重新分析数据
荧光信号过高且平台期信号不稳定	使用 None ROX 的 Mix，但仪器校正染料设置错误，未选择“None”	仪器校正染料设置为“None”，或根据机型更换为带校正染料的 Mix
个别孔扩增曲线突然骤降	反应管内留有气泡	确保 Mix 完全溶解，请勿涡旋振荡混匀 加样完成后进行离心去除气泡 延长预变性时间至 10 min，以去除气泡
反应结束无扩增曲线出现	反应循环数偏少	设置循环数为 40，但更多的循环数会增加过多的背景信号
	荧光信号采集步骤未设置或者设置错误	两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火 & 延伸阶段
	引物可能降解	长期未用的引物，应先通过 PAGE 电泳检测完整性，以排除其降解的可能
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数重复实验，样品浓度未知的情况下先从最高浓度做起
	模板降解	重新制备模板，重复实验
扩增曲线荧光信号很弱或扩增曲线呈锯齿状	检测荧光光谱设定误差	参考仪器的使用说明书，根据所用仪器的型号设置的可检测的荧光信号范围选择探针的发光基团、淬灭基团，重新确定参数设置
	探针纯度低，质量较差	使用 HPLC 级别以上纯化的探针，保存避免反复冻融，探针降解会导致基线上飘
	荧光信号采集时间过短	对部分仪器，需要更长的延伸时间来充分采集荧光。扩增曲线锯齿状较明显时，将延伸时间设定为 30~60 sec 可得到改善
Cq 值出现过晚	扩增效率低	优化反应条件，或者重新设计引物
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数重复实验，样品浓度未知的情况下先从最高浓度做起
	模板降解	重新制备模板，重复实验
	扩增产物过长	推荐 PCR 产物长度 80~200 bp
	体系中存在 PCR 抑制剂	一般为模板带入，加大模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验
空白对照出现信号	反应体系污染	首先更换空白对照的水，如果还发生同样情况，继续更换引物、吸头、PCR 管或启用新的 Mix 反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染
实验重复性差	加样误差大	使用精准的移液器、配合高品质吸头准确移液 将模板进行稀释，加入大体积模板减少加样误差 放大 qPCR 反应体系
	样品纯度低	重新制备更高纯度的样品
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数重复实验；也可能是浓度较低的样本放置时间过长导致样本丢失，实际浓度较低，建议用原液重新稀释样品重复实验
	qPCR 仪不同位置的温度偏差	定期校准 qPCR 仪
标准曲线的线性关系不佳	加样误差导致模板的加入量不成梯度	避免模板反复冻融导致降解，重新制备模板，重新加样
	探针或引物不佳	重新稀释探针和引物加样；通过琼脂糖凝胶电泳确认是否有非特异性扩增、引物二聚体等，如引物不佳需更换引物
	模板浓度不佳	重新制备模板或降低起始模板浓度

☎ 400-820-2141

莫纳生物科技有限公司  
Monad Biotech Co., Ltd.

Tel: +86-(0)21-64868889  
Fax: +86-(0)21-64868669

E-mail: support@monadbiotech.com  
www.monadbiotech.com

最终解释权所有 © 莫纳生物科技有限公司，保留一切权利



Simply Discover More