

## Universal SYBR qPCR Master Mix

### 通用荧光定量 PCR 试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL697A	通用荧光定量 PCR 试剂盒	5 x 1ml

#### 产品简介:

本产品是采用 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。采用抗体法热启动 Taq 酶, 高温加热前, 抗 Taq 单克隆抗体与 Taq 酶紧密结合, 抑制 Taq 的聚合酶活性, 从而抑制在低温条件下出现的由引物和模板 DNA 非特异性杂交或引物二聚体引起的非特异性扩增。抗体会在 PCR 反应的预变性步骤中完全失活, 不会干扰后续的 Taq 酶聚合反应, 大大提高了 PCR 反应的灵敏度及特异性。2x 浓度预混反应体系, 最大限度地减少人为误差、降低污染机率、节约实验操作时间, 快速简便、通用性广、灵敏度高、特异性强、稳定性好。

#### 产品组分:

产品编号	产品名称	规格
1	2×Universal SYBR qPCR Mix	5 x 1ml
2	ROX Reference Dye(25mM)	200ul

#### 保存条件:

收到本产品后, 请立即置于-20°C避光保存, 一年有效。从-20°C取出使用时, 将冻存的 Universal SYBR qPCR Mix 和 ROX Reference Dye 融解, 然后轻轻颠倒混匀, 待溶液完全均一后再行使用。如需一段时间内经常取用, 可在 2~8°C条件下储存 3 个月。避免反复多次冻融。

#### 使用说明:

##### 一、配制 Real-Time PCR 反应体系:

1、将所有试剂 2×Universal SYBR qPCR Mix, ROX Reference Dye, 模板, 引物和 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 在室温下融解并彻底混匀, 避免产生气泡。短暂离心后, 置于冰上按照下表配制反应液。

参考下表配制反应体系:

组分	20 ul 体系	50 ul 体系
2×Universal SYBR qPCR Mix	10 μl	25 ul
Primer F (10 μM)*	0.5 μl	1 ul
Primer R (10 μM)*	0.5 μl	1 ul
cDNA 模板**	1 ul	1 ul
ROX Reference Dye***	0.4 ul	1 ul
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	补至 20 μl	补至 50ul

\* 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 uM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度 0.2~0.4 uM 范围内调整引物浓度，为获得理想的 qPCR 效果，扩增片段的长度建议为 80-200bp。

\*\* 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（两步法反转录）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%。

\*\*\* 不同仪器 ROX Reference Dye 推荐使用终浓度见下表：

仪器型号	ROX 用量 (50ul 体系)	ROX 终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/StepOne/ StepOne Plus 等	1 ul (0.6~1.0ul)	500nM (300~500nM)
ABI 7500/7500 Fast、QuantStudio® 3/5、QuantStudio 6/7 Flex、ViiA 7、Stratagene Mx3000P/Mx3005P和Mx4000等	0.1 ul (0.06~0.1 ul)	50nM (30~50nM)
Roche、Bio-Rad、Eppendorf 等	无需添加	

2、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。

## 二、进行 Real-Time PCR 反应

1、建议采用两步法 PCR 反应程序进行反应。

两步法反应程序：

步骤	温度	持续时间	循环数
预变性	95°C	2 min	1
变性	95°C	15 sec	40
退火延伸数据采集	60°C	15-30 sec	40
熔解曲线分析	根据仪器推荐程序设置		

若模板量较低等因素导致扩增效果不佳，或者对于超过 350 bp 或者高 GC 含量的扩增子，建议增加延伸时间至 60 s 或者采用三步法以提高扩增效率。

三步法反应程序：

步骤	温度	持续时间	循环数
预变性	95°C	2 min	1
变性	95°C	15 sec	40
退火	50-60°C	15-30 sec	40
延伸数据采集	72°C	30 sec	40
熔解曲线分析	根据仪器推荐程序设置		

注：本产品是使用抗体修饰的 HotStart DNA 聚合酶，如果在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、2 min，复杂或高 GC 模板适当延长至 5 min。

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有所差异，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

2、上机检测：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。

## 常见问题

### 1、无扩增信号或扩增曲线起峰晚或仅有引物二聚体

原因	解决办法
DNA 模板中存在抑制剂	重新纯化模板。
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。
PCR 条件、引物序列或浓度不当	请确认引物未发生降解，引物浓度及 PCR 条件。对于 GC 含量高的模板，可以适当延长变性时间。如果还是扩增不好，请重新设计引物。
起始模板问题	检查起始模板的浓度，保存条件和质量。重新对模板进行线性梯度稀释进行实验。增加起始模板使用量。
加样错误或试剂问题	检查试剂浓度和保存条件，包括所使用的引物和模板。重复进行实验。

### 2、NTC 出现较高的荧光值

原因	解决办法
试剂污染	建议使用新试剂进行实验。
PCR 反应液配制时发生污染	采取必要的防污染策略（如使用带滤芯的枪头）。
引物出现降解	可以使用变性聚丙烯酰胺胶检测引物降解情况。

### 3、出现引物二聚体和（或）非特异扩增

原因	解决办法
PCR 退火温度太低	建议每次增加 2°C 进行退火温度优化。
引物设计不合适	考虑重新设计引物序列。
PCR 产物太长	荧光定量 PCR 产物长度最好在 100-150 bp 之间，而且不应该超过 500 bp。
引物出现降解	可以使用变性聚丙烯酰胺胶检测引物降解情况。
计量误差	反应体积太小会导致检测精度下降。请根据定量 PCR 仪推荐的反应体积重新实验。

### 4、定量值重现性差

原因	解决办法
仪器方面的故障	因为仪器的不适用，在温度管理或检测时产生重现性差。请根据相应仪器的说明书进行点检。
样品纯度不好	不纯的样品会导致实验的重现性差。
稀释的模板放置太久	通过梯度稀释的模板最好现配现用。
引物质量下降	尽量避免新合成引物批次间的差异，可以使用原来质量好的引物做为对照。
PCR 反应条件、引物浓度、序列等不恰当	扩增效率差的 PCR 容易产生重现性差。通过变更引物的浓度或 PCR 反应条件来进行调整。扩增不好时，一般可降低退火温度或提高引物浓度，也可以延长延伸时间。如模板的 GC 含量较高，可延长变性时间。仍

	得不到改善时，建议重新设计引物。
计量误差	反应体积太小会导检测精度下降。请根据定量 PCR 仪推荐的反应体积重新实验。

**注意事项：**

- 1、本产品中含有荧光染料 SYBR Green I，保存本产品或配制时应避免强光照射。
- 2、使用时请上下颠倒轻轻混匀，不要使用振荡器，尽量避免出现泡沫，短暂离心后使用。
- 3、引物纯度对反应特异性影响很大，建议使用 PAGE 级别以上纯化的引物。
- 4、反应液的配制、分装请一定使用无污染的枪头、PCR 管等，尽量避免交叉污染
- 5、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。