

通用型实时荧光定量PCR预混试剂(SYBR Green)

Universal qPCR Premix (SYBR Green)

本产品需冰袋运输；-20℃避光保存，尽量避免反复冻融，保质期24个月；
预混液融化后可在4℃避光条件下稳定存放一个月。

货号规格

货号	规格
MH101	1 mL×5

产品内容

组分	规格
Universal qPCR Premix(SYBR Green)	1 mL×5

产品简介

本产品是 SYBR Green I 嵌合染料法专用 qPCR 试剂, 2× 预混液中包含了除引物和 DNA 模板以外的所有 qPCR 组分, 从而减少加样步骤, 降低污染几率。其中核心组分——经抗体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶, 具有高特异性、高检测灵敏度、高扩增产量等诸多优点, 配合精心优化的缓冲液体系及 PCR 反应促进因子, 可有效抑制非特异性扩增, 对较宽浓度范围的模板进行准确定量, 获得稳定可靠的 qPCR 结果。

本产品 2× 预混液中含有独特的校正染料, 与一系列 ROX qPCR 设备兼容, 包括需要 ROX 校正的仪器, 实验操作过程中无需额外添加染料来校正仪器。

操作步骤

1. 按下列体系配制 qPCR 反应液

试剂	使用量	终浓度
Universal qPCR Premix	10 μL	1×
正向引物(10 μM)*	0.4 μL	0.2 μM
反向引物(10 μM)*	0.4 μL	0.2 μM
DNA模板**	x μL	10~200 ng/20 μL
Nuclease-Free Water	To 20 μL	

* 推荐引物终浓度为0.2 μM, 若实验结果不理想, 可在0.1-1 μM范围内进行调整;

** 推荐模板加样量为1-2 μL, 不同DNA模板中含有靶基因拷贝数目不同, 必要时可进行梯度稀释, 以确定DNA模板最佳添加量; 若模板为未稀释cDNA原液, 添加量不应超过总反应体系的10%。

2. 按下列程序进行 qPCR 反应

两步法

步骤	温度	时间
预变性	95℃	30 sec
变性	95℃	10 sec
退火及延伸*	60℃	30 sec
熔解曲线**	使用仪器默认采集程序	

← 40 Cycles



三步法

步骤	温度	时间
预变性	95°C	30 sec
变性	95°C	10 sec
退火*	55~65°C	10 sec
延伸*	72°C	30 sec
熔解曲线**	使用仪器默认采集程序	

40 Cycles

* 根据引物的T_m值进行退火及延伸(退火)温度的设定;若扩增片段在200 bp以内,退火及延伸(延伸)时间可设置为15 sec;此外,退火及延伸(延伸)时间的设置还需根据不同品牌qPCR仪所需要的最短数据采集时间进行调整;

** 不同qPCR仪的熔解曲线采集程序有所差别,一般使用仪器默认的采集程序即可。

注意事项

1. 配制反应体系过程应避免强光照射;
2. 本产品使用前需上下颠倒轻轻混匀,请勿涡旋振荡,避免产生过多气泡;
3. 本产品中含有通用校正染料,适用于所有机型,无需额外添加染料;
4. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作;
5. 本产品仅限科研使用。

常见问题

问题描述	可能原因	解决方案
无扩增曲线	未设置荧光信号采集步骤或设置错误	两步法扩增程序一般将信号采集步骤设置在退火及延伸阶段;三步法扩增程序应将信号采集步骤设置在72°C延伸阶段。
	反应循环数偏少	将循环数设置为40,但更多的循环数会增加过多的背景信号。
	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	减小模板稀释倍数,重复实验;样品浓度未知的情况下,应先从最高浓度尝试。
	模板降解	重新制备模板,重复实验。
扩增曲线不光滑	荧光信号太弱,经系统校正后产生	确保Premix中预混的染料未降解;更换荧光信号收集更好的qPCR专用耗材。
扩增曲线断裂或下滑	模板浓度较高,基线的终点值大于C _q 值	减小基线的终点值(C _q 值-4),重新分析数据。
个别孔扩增曲线突然骤降	反应管内留有气泡	确保试剂完全溶解,请勿涡旋振荡混匀;加样完成后轻弹反应管并离心去除气泡;延长预变性时间至10 min,以去除气泡。

问题描述	可能原因	解决方案
Cq值出现过晚	扩增效率低	提高引物浓度，尝试三步法扩增程序，或者重新设计引物。
	模板降解	重新制备模板，重复实验。
	模板浓度过低	减小模板稀释倍数，重复实验； 样品浓度未知的情况下，应先从最高浓度尝试。
	扩增产物过长	扩增产物长度需控制在80~200 bp。
	反应体系中存在PCR抑制剂	抑制剂一般都是由模板带入反应体系的，故需加大模板稀释倍数或重新制备纯度更高的模板重复实验。
熔解曲线出现多峰	引物浓度过高	适当降低引物浓度。
	引物设计不佳	根据引物设计原则重新设计新引物。
	cDNA模板存在基因组DNA污染	提取后的RNA溶液需使用DNA酶(如:dsDNase)进行消化，以去除基因组DNA污染，或设计跨内含子引物。
实验重复性差	加样误差大	需使用精准的移液器，配合高品质吸头准确移液； 加大模板DNA稀释倍数，从而增大模板体积加样量，减少加样误差； 放大qPCR反应体积。
	模板DNA浓度过低	减小模板DNA稀释倍数重复实验。
	qPCR仪不同位置的温度存在偏差	定期校准qPCR仪。
空白对照出现信号	出现引物二聚体等非特异性扩增	若在35循环以后空白对照出现扩增产物，此为正常情况，应配合熔解曲线进行分析； 重新设计引物，调整引物浓度或优化PCR反应程序。
	反应体系被污染	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管或用新开管的预混液在超净工作台内配制重新配制反应体系，减少气溶胶污染。