

# 产品说明书

产品名称：**2× SYBR Green qPCR Premix (Universal)**

产品货号：**KS0601-500**

产品规格：**1mL×5支**

## 储存条件

-20℃避光保存至少一年，避免反复冻融。Mix融解后可在4℃避光条件下稳定存放一个月，尽量避免反复冻融。

## 产品介绍

2×SYBR Green qPCR Premix 试剂，为2×预混液，包含除引物和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，配合精心优化的Buffer体系以及PCR反应促进因子，使产品具有特异性强、扩增效率高等特点，有效抑制非特异性扩增，可对宽广浓度范围的模板进行准确定量，获得稳定可靠的qPCR结果。

## 注意事项：

- 1、因Mix中预混有染料，其保存或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；

## 建议的qPCR反应体系

试剂名称	使用量	浓度
2×SYBR Green qPCR Premix	10 μl	1×
正向引物	0.4 μl	0.2 μM
反向引物	0.4 μl	0.2 μM
cDNA模板	1-2 μl	10-200 ng/20 μl
Nuclease-Free Water	To 20 μl	

一般根据引物的 $T_m$ 值进行退火&延伸温度的设置；若扩增片段在200 bp以内，退火&延伸的时间可以设置为15 sec，退火&延伸时间的设置还需根据您使用的qPCR仪所需要的最短数据采集时间自行调整。

### 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	30 sec
变性	95°C	10 sec
退火 & 延伸 <sup>a</sup>	60°C	30 sec
使用仪器默认采集程序		
熔解曲线 <sup>b</sup>		

} 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 <sup>a</sup>	55-65°C	10 sec
延伸 <sup>a</sup>	72°C	30 sec
使用仪器默认采集程序		
熔解曲线 <sup>b</sup>		

} 40 Cycles

a. 根据引物的 $T_m$ 值进行退火&延伸（退火）温度的设定；若扩增片段在200 bp以内，退火&延伸（延伸）时间可以设置为15 sec；此外，退火&延伸（延伸）时间的设置还需根据您使用的qPCR仪所需要的最短数据采集时间自行调整；

b. 不同 qPCR 仪的熔解曲线采集程序有差别，一般可使用仪器默认的溶解曲线采集程序。

### 实验优化

若使用默认反应条件反应性能不佳时，则需要对反应条件进行优化，可以从引物浓度及扩增程序两个方面进行：

①**引物浓度调整** 当引物终浓度在0.1-1.0  $\mu\text{M}$ 范围之间变化时，引物浓度越低，扩增特异性越高，但扩增效率会有所下降。

②**扩增程序优化** 需提高扩增特异性，可使用两步法程序或提高退火温度；需提高扩增效率，可使用三步法程序或延长延伸时间。

## 常见问题

问题	分析	解决方案
扩增曲线不光滑	荧光信号太弱，经系统校正后产生	确保Mix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Cq值	减小基线终点 (Cq 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Mix完全溶解，请勿涡旋振荡混匀；加样完成后轻弹离心去除气泡；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，三步法扩增程序应当将信号采集设置在72℃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
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	扩增产物过长 扩增产物长度控制在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重新制备纯度高的模板重复实验
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

本产品仅用于科研

		台内配制，减少气溶胶污染
	出现引物二聚体等非特异性扩增	一般在 35 循环以后空白对照出现扩增产物属正常情况，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
熔解曲线出现多峰	引物设计不佳	根据引物设计原则重新设计新引物
	引物浓度过高	适当降低引物浓度
	cDNA 模板存在基因组污染	提取后的 RNA 溶液使用DNA酶进行消化，例如：dsDNase，以去除基因组污染，或设计跨内含子引物
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 高倍稀释模板，加入大体积模板减少加样误差 放大 qPCR 反应体积
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数重复实验
	qPCR 仪不同位置的温度偏差	定期校准 qPCR 仪