

2×Universal SYBR qPCR Master QP101



产品概述

Product Overview

本产品为实时荧光定量 PCR 扩增的预混合溶液，反应液中已包含 Taq enzyme mix、SYBR Green I、dNTP、Mg²⁺、Rox 以及优化的缓冲体系，配制 qPCR 反应时只需加入引物和模板即可进行扩增，减少了操作步骤，降低污染概率，提高了实验的可重复性及结果稳定性。

本品扩增性能强，灵敏度高，随着模板浓度梯度降低，呈现良好的扩增曲线及扩增效率；稳定性好，可以有效抑制非特异性 PCR 扩增。同时，本产品已调整最优 ROX 添加比例，无需单独添加 ROX 染料，适用于不同型号荧光定量 PCR 仪。ROX 的作用是用于校正与 PCR 无关的荧光波动，从而减少孔间差异。此外，本品除了保证常规荧光定量扩增效果，特别对于高 GC 含量（≤78%）的扩增片段，扩增效果极好。

产品组成

Product Composition

组 分	QP101A	QP101B
2×Universal SYBR qPCR Master Mix	4×1.25 mL	5×QP101A

注意事项

Precautions

1. 产品第一次使用时，先颠倒混匀离心然后再使用，避免试剂不均匀，若发现 Master Mix 解冻后有些许白色沉淀，请室温下放置片刻并上下颠倒，沉淀溶解后使用。
2. 本品含有荧光染料 SYBR Green I，保存或配制反应体系时需避免强光照射。
3. 反应体系需要在冰上配制，最后将配制好的反应液放置于 qPCR 仪中反应。
4. 使用前务必充分混匀，但避免剧烈震荡产生过多气泡影响荧光信号值采集。

操作流程

Operation Process

1. 体系配制

组分	使用量
RNase Free H ₂ O	Up to 20 μL ^{*1}
2×Universal SYBR qPCR Master Mix	10 μL
Primer 1 (10 μM)	0.5 - 1 μL
Primer 2 (10 μM)	0.5 - 1 μL
Template DNA ^{*2}	1 - 2 μL

*1: 推荐使用 20 μL，以保证目的基因扩增的有效性和重复性；

*2: 可根据 CT 值大小稀释调整模板 DNA 浓度。

2. 反应程序

步骤	时间	
95°C	30 sec ^{*1}	预变性
95°C	5 sec	} 40 - 45 Cycles
60°C ^{*2}	10 - 30 sec ^{*3}	
熔解曲线	仪器默认设置	

*1: 大部分模板可使用该条件进行变性，模板复杂时可调整预变性时间；

*2: 荧光信号采集。

*3: 标准程序选择 30 sec；快速程序：对于 200 bp 以内的扩增子最短可设为 10 sec；超过 200 bp 的扩增子，推荐延伸时间为 30 sec。

保存条件

Storage Conditions

-30 ~ -15°C保存，干冰/-20°C运输。

1. 溶解曲线出现非特异峰

在目的峰前端，即 $T_m=75$ 左右出现的峰为引物二聚体峰；紧挨着目的峰前后，有可能是非特异产物峰或者是 gDNA 扩增峰；分析如下：

- 1) 引物设计不优，需根据设计原则设计合成新的引物。
- 2) 引物浓度太高：适当降低引物浓度。
- 3) 检测的目的基因同源家族基因较多，重新设计引物或采用探针法进行定量检测；
- 4) cDNA 模板带有基因组污染：重新制备 cDNA 模板。

2. 扩增曲线形状异常

- 1) 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统矫正后产生。提高模板浓度重复实验。
- 2) 扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于 CT 值。减小基线终点(CT 值-4)，重新分析数据。
- 3) 个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡。处理样本时要注意离心，进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

3. 反应结束无扩增曲线出现

- 1) 反应循环数不够：一般设置循环数为 40，但需要注意的是过多的循环会增加过多的背景信号，降低数据可信度。
- 2) 确认程序中是否设置了信号采集步骤：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°C 延伸阶段。
- 3) 确认引物是否降解：长时间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。
- 4) 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- 5) 模板降解：重新制备模板，重复实验。

4. CT 值出现太晚

- 1) 扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计合成引物。
- 2) 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- 3) 模板降解：重新制备模板，重复实验。
- 4) PCR 产物太长：推荐 PCR 产物长度为 80 - 150 bp。
- 5) 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。

5. 阴性对照出现明显扩增

- 1) 反应体系污染：更换新的 Mix、ddH₂O、引物重复实验。反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染。
- 2) 引物二聚体的出现：配合溶解曲线进行分析。

6. 绝对定量时标准曲线线性关系不佳

- 1) 加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积。
- 2) 标准品降解：重新制备标准品，重复实验。
- 3) 模板浓度太高：提高模板稀释倍数。

7. 实验重复性差

- 1) 加样体积失准：使用性能较好的移液器；将模板做高倍稀释，以大体积加入反应体系中。
- 2) 定量 PCR 仪的不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。
- 3) 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。