



2×Color Universal SYBR qPCR Mix QP102

产品概述

Product Overview

本产品为 SYBR Green 染料法 qPCR 反应的预混液,预混液中除了包含 SYBR GreenI、dNTP、Mg²⁺、Rox 以及优化的缓冲体系外,还添加了由抗体结合的热启动 Taq 酶,显著提高 qPCR 反应的特异性和灵敏度。配制 qPCR 反应体系时,仅需加入引物和模板即可,减少操作步骤,降低交叉污染风险,确保实验结果的可重复性和稳定性。此外,本品通过不同染料混合后的变色效应监控移液过程,从而显著减少移液错误。

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,在 20 次反复冻融或 37°C 下保存 15 天后性能仍然稳定;内含特殊的 ROX 染料,无需额外添加即可适配多种荧光定量 PCR 仪;其特有的抑制因子能有效阻止引物二聚体的形成,确保 CT 值真实可信。除此之外,对高 GC 含量的模板扩增效果极好。

产品组成

Product Composition

组 分	QP102A	QP102B
2×Blue Universal SYBR qPCR Mix *1	4×1.25 mL	
10×Dilution buffer *2	1.25 mL	5×QP102A

*1: 包含dNTP, Mg²⁺, Taq DNA Polymerase, SYBR Green I, 蓝色显色染料等。

*2: 10×黄色浓缩模板稀释液。

注意事项

Precautions

- 2×Blue Universal SYBR qPCR Mix 中包含蓝色染料, 10×Dilution Buffer 中包含黄色染料。当 2×Blue Universal SYBR qPCR Mix (蓝色) 中加入了用 Dilution Buffer 稀释的扩增模板(黄色)后会产生蓝色→绿色的变色效应, 从而可以根据液体颜色准确判断是否已加入模板。
- 10×Dilution Buffer 为专用浓缩模板稀释液。使用过程中, 如需要进行移液追踪, 则根据下表选择合适的方式提前添加 Dilution Buffer 至模板中, 然后进行 qPCR 检测; 如不需要进行移液追踪, 则不使用 Dilution Buffer 即可。

模板状态	实例	10×Dilution Buffer 使用方式
斑块/粉末	未溶解 DNA 沉淀斑块	使用 ddH ₂ O 将 10×Dilution Buffer 稀释至 1×, 将合适体积的 1× Dilution Buffer 用作溶解液溶解斑块/粉末
溶液	cDNA 溶液, 已溶解的质粒、基因组	如有必要, 先使用 ddH ₂ O 将模板稀释至目标浓度, 然后在每 9 μL 模板中加入 1 μL 10×Dilution Buffer

3. 如使用 Dilution Buffer 进行移液追踪(qPCR 模板中已包含 1×Dilution Buffer) ,模板使用体积请勿超出 2 - 5 $\mu\text{L}/20 \mu\text{L}$ reaction 范围。如果模板使用量低于 2 $\mu\text{L}/20 \mu\text{L}$ reaction, 会造成显色偏淡, 影响追踪效果; 如果模板使用量高于 5 $\mu\text{L}/20 \mu\text{L}$ reaction, Dilution Buffer 中的有效成分有可能会干扰 qPCR 反应。Dilution Buffer 如果使用方式不当, 有可能对 qPCR 结果产生一定的影响。

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×Blue Universal SYBR qPCR 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	} 40 - 45 Cycles
95°C	5 sec	
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。保质期24个月。

1. 溶解曲线出现非特异峰

在目的峰前端，即 $T_m=75^{\circ}\text{C}$ 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。