

2x SYBR Green qPCR Mix (Universal)**2×染料法荧光定量预混液 (通用型)**

目录号: 7500

保存条件

长期保存请于 -20°C 避光保存, 融解后可在 4°C 避光条件下稳定存放一个月, 尽量避免反复冻融。

产品组成

组分	规格
2x SYBR Green qPCR mix	5×1 ml

产品简介

本产品是使用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 反应的专用预混液, 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。

预混液中含有独特校正染料, 与一系列 qPCR 设备兼容, 包括需要 ROX 校正的仪器, 实验操作过程中不需要额外添加染料来校正仪器。

使用方法**1. 使用注意**

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;

③ Mix 中含有 Universal 校正染料, 适用于所有机型, 无需额外添加染料。

2. 建议的 qPCR 反应体系

试剂	使用量	终浓度
2x SYBR Green qPCR mix	10 µl	1×
正向引物 (10 µM) ^a	0.4 µl	0.2µM
反向引物 (10 µM) ^a	0.4 µl	0.2µM
模板 DNA ^b	X µl	10~200ng/20µl
Nuclease-Free Water	To 20 µl	

a. 通常推荐的引物终浓度为 0.2 µM, 反应效果不佳时可在 0.1~1 µM 范围内进行调整;

b. 推荐模板加样量为 1~2 µl, 如模板类型为未稀释 cDNA 原液, 模板添加量不应超过总反应体系的 10%。不同种类 DNA 模板中含有的靶基因拷贝数目不同, 必要时可进行梯度稀释, 以确定最佳的 DNA 模板添加量。

3. 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	} 40 Cycles
退火 & 延伸 ^c	60°C	30 sec	
熔解曲线 ^d	使用仪器默认采集程序		

三步法

步骤	温度	时间	
预变性	95°C	30 sec	
变性	95°C	10 sec	} 40 Cycles
退火 ^c	55~65°C	10 sec	
延伸 ^c	72°C	30 sec	
熔解曲线 ^d	使用仪器默认采集程序		

c. 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 仪所需的最短数据采集时间自行调整;

d. 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熔解曲线 采集程序。

4. 实验优化

若使用默认反应条件反应性能不佳时, 则需要对反应条件的优化, 可以从引物浓度以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 µM 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。

5. 引物设计原则

① 扩增产物长度建议控制在 80~200 bp;

② 引物长度为 18~25 bp;

③ 正向引物和反向引物的 T_m 值相差不超过 1°C 为佳, T_m 值控制在 58~62°C 为佳;

④ 引物的 GC 含量控制在 40%~60% 之间;

⑤ 引物 A、G、C、T 整体分布尽量要均匀, 避开 T/C 或者 A/G 的连续结构 (特别是 3' 端);

⑥ 引物 3' 端最后一个碱基最好为 G 或者 C;

⑦ 避开引物内部或者两条引物之间的互补序列;

⑧ 使用 NCBI BLAST 功能检索确认引物的特异性。

常见问题与解决方案

扩增曲线形状异常

- ① 扩增曲线不光滑：荧光信号太弱，经系统矫正后产生。提高模板浓度重复实验；
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。
- 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。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，进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

◇ 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。

◇ 阴性对照出现明显扩增

- ① 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，继续更换新的 Mix、ddH₂O、引物、PCR 管重复实验。
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：一般在 35 循环以后空白对照出现扩增产物属正常情况，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

- ① 引物设计不优：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 cDNA 模板带有基因组污染：重新制备 cDNA 模板。

◇ 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。

◇ 实验重复性差

- ① 加样体积失准：使用性能较好的移液枪；将模板做高倍稀释，以大体积加入反应体系中。
- ② 定量 PCR 仪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。

◇ 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。