

Version: AH 1.0 (2024.12.09制定)

## 2× Universal SYBR Green qPCR Mix

目录号: AH0105

### 01/产品组分

序号	组分	AH0105-A 125 rxn (20 μL/rxn)	AH0105-B 500 rxn (20 μL/rxn)	AH0105-C 500 rxn (20 μL/rxn) ×5
1	2× Universal SYBR Green qPCR Mix	1.25 mL	1.25 mL×4	AH0105-B×5
2	RNase Free H <sub>2</sub> O	1.25 mL	1.25 mL×4	

### 02/保存条件

本产品 2× Universal SYBR Green qPCR Mix 于-20°C避光保存。

### 03/产品概述

本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。其核心组分采用新型抗体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶，配以精心优化的 Buffer 以及 PCR 反应促进因子，具有灵敏度高、特异性强、扩增效率高、稳定性好等特点。本产品中含有特殊的校正染料 ROX Reference Dye，适用于所有 qPCR 仪器，无需根据不同仪器上调整 ROX 的浓度。使用时只需加入模板、引物和水，便可在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，并且可对靶基因进行准确定量，获得重复性好，可信度高的 qPCR 结果。

### 04/注意事项

#### 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 因 Mix 中预混有染料，强光下易分解，其保存或者使用时应避免强光照射。
- ◇ 建议 PCR 反应液在冰上配制，可以提高扩增特异性，减少背景。
- ◇ 请冰上融化后，轻轻上下颠倒，混合均匀，避免产生气泡，并瞬时离心后使用。
- ◇ 因 Mix 中含有特殊的校正染料 ROX Reference Dye，适用于所有机型，无需额外添加。

## 05/PCR实验流程

以10 μL, 20 μL反应体系为例, 其他体系可以按照表格Final Concentration所示比例进行调整配制:

### 1. 配制PCR反应液:

Components	Volume (10 μL)	Volume (20 μL)	Final Concentration
2× Universal SYBR Green qPCR Mix	5 μL	10 μL	1×
DNA/cDNA*	X μL	X μL	as required
Forward Primer (10 μM) *	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
Reverse Primer (10 μM) *	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
RNase Free H <sub>2</sub> O	up to 10 μL	up to 20 μL	

\* 如模板类型为DNA, 20 μL体系参考加入量10-200 ng, 可根据实际情况进行调整。如模板类型为未稀释cDNA原液, 使用体积不应超过qPCR反应总体积的1/10。因不同种类模板中含有的靶基因拷贝数不同, 必要时可进行梯度稀释, 以确定最佳模板添加量。

\* 通常反应体系中引物终浓度为0.2 μM即可得到较好的扩增效果, 反应效果不佳时可在0.1-1 μM范围内进行调整。

### 2. 设置PCR反应程序:

#### PCR循环 (二步法)

95°C: 30 sec<sup>\*1</sup>  
 95°C: 3-10 sec  
 60°C<sup>\*2</sup>: 10-30 sec<sup>\*3</sup> } 40 cycles  
 Dissociation Stage<sup>\*4</sup>

#### PCR循环 (三步法)

95°C: 30 sec<sup>\*1</sup>  
 95°C: 10 sec  
 55-65°C<sup>\*2</sup>: 10 sec  
 72°C: 10-30 sec<sup>\*3</sup> } 40 cycles  
 Dissociation Stage<sup>\*4</sup>

\*1 该预变性条件适合绝大多数扩增反应, 如模板结构复杂, 可将预变性时间延长至5 min。

\*2 依据所研究的目的基因引物的T<sub>m</sub>设置最适退火温度。

\*3 延伸时间请根据使用的机型所需要的数据采集最短时间限制自行调整。超过200 bp的扩增子推荐延伸时间为30 sec。

\*4 使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。

## 06/相关产品

AC0101 SparkZol Reagent

AC0202 SPARKeasy 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒 (含基因组 DNA 清除柱)

AC0205 SPARKeasy 细胞 RNA 快速提取试剂盒

AC1709 RNase Free and DNase Free 纯水

AG0304 SPARKscript II RT Plus Kit (With gDNA Eraser)

AG0305 SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR (With gDNA Eraser)

## 07/常见问题及解决方案

### 扩增曲线形状异常

- (1) 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统校正后产生。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。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。

### 反应结束无扩增曲线出现

- (1) 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。
- (2) 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°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：减少模板稀释倍数重复实验，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。

### Ct 值出现太晚

- (1) 扩增效率低：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：减少模板稀释倍数重复实验，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) 扩增产物太长：推荐扩增产物长度为 80 - 200 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纯度高的模板重复实验。

### 阴性对照出现明显扩增

- (1) 反应体系污染：更换新的 Mix、RNase Free H<sub>2</sub>O、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) 出现引物二聚体非特异性扩增：一般在 35 循环以后阴性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

- (1) 引物设计不佳：根据设计原则重新设计合成新引物。
- (2) 引物浓度太高：适当降低引物浓度。
- (3) 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，去除基因组污染，或设计跨内含子的引物。

### 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：使用精准的移液枪；高倍稀释模板，加入大体积模板以减少加样误差。

(2) qPCR 仪不同位置的温度偏差：定期校准仪器。

(3) 模板浓度太低：减少模板稀释度或提高加样体积重复实验。

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: [support@sparkjade.com](mailto:support@sparkjade.com)

