

**2 × Universal SYBR
Green qPCR Premix
使用说明书** Cat # Q01



www.affinibody.com
Swiss Affinibody LifeScience

Version 2.2 V

目录 Contents

01 产品概述	02
02 产品组分	02
03 储存条件	02
04 适用范围	02
05 注意事项	02
06 使用方法	03
06-1 qPCR反应体系	03
06-2 qPCR反应程序	03
07 引物设计	04
08 常见问题与解决方案	04
08-1 扩增曲线异常	04
08-2 无扩增曲线	05
08-3 C_t 值偏大	05
08-4 空白对照(NTC)出现信号	05
08-5 熔解曲线出现多峰	05
08-6 重复性差	05
08-7 标准曲线线性关系不好	06


01 产品概述

本产品为通用型2× 预混液，是使用SYBR Green I 嵌合荧光法进行qPCR的专用试剂，操作时只需加入引物，模板以及RNase free H₂O即可进行实验，减少步骤，缩短时间，降低污染机率。Mix中特有的Taq DNA聚合酶，是全新一代基于抗体修饰升级改造的热启动聚合酶，具有极高的灵敏度，特异性以及扩增产量，配合精心优化的Buffer 体系以及 PCR 反应促进因子，能够有效抑制非特异性扩增，从而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。

本产品中已含特殊的校正染料，兼容一系列qPCR仪器，不需要额外添加染料。

02 产品组分

组分	Q01
2× Universal SYBR Green qPCR Premix	5 × 1 mL

 包含Taq DNA polymerase, dNTP, Mg²⁺, SYBR Green I, Specific Reference Dye等。

03 储存条件

-20℃ 避光保存，解冻后可在4℃避光条件下稳定存放1个月；运输温度：≤0℃。

 尽量避免反复冻融。

04 适用范围

本产品适用于一系列qPCR仪器，进行所有物种来源的DNA样本扩增定量，类型可以是基因组DNA、cDNA、质粒DNA、λDNA等。

05 注意事项


- ① 本产品混有染料，保存或使用过程中请尽量避免；
- ② 使用前请上下颠倒混匀Mix，短暂离心后即可使用；不要涡旋，以免产生过多气泡；加样时需轻轻吹打，如果Mix产生气泡，需再次离心消除气泡后继续实验，以免影响定量结果；
- ③ 请在超净工作台内进行实验，并使用灭菌的枪头以及反应管，避免空气中气溶胶的污染；
- ④ 建议对Mix进行分装，避免反复冻融，影响酶活。

06 使用方法

06-1 qPCR反应体系

按照如下表格，于冰上配制qPCR反应体系；每组至少需要三个生物学重复用于定量分析：

组分	20 μ L 反应体系	终浓度
2 \times Universal SYBR Green qPCR Premix	10 μ L	1 \times
正向引物 (10 μ M)	0.4 μ L	0.2 μ M
反向引物 (10 μ M)	0.4 μ L	0.2 μ M
cDNA模板 (10-100 ng/ μ L)	1-2 μ L	0.5-10 ng/ μ L
无核酸酶 ddH ₂ O	至 20 μ L	-

-  a. 推荐引物终浓度为0.2 μ M，也可根据实验在0.1~1 μ M之间进行调整；
- b. 由于qPCR灵敏度极高，建议对模板进行5-10倍的稀释，提高模板使用量的准确度以及实验的重复性；
- c. 如果模板为未稀释的cDNA原液，添加量不超过反应总体积的10%；
- d. 不要用手触碰8联排PCR管的管盖以及底部，请佩戴一次性手套进行操作；
- f. 建议在超净工作台内配制反应体系，并使用带滤芯的枪头。避免交叉污染和气溶胶污染。

06-2 qPCR反应程序

将各组分混匀并短暂离心后，可参考如下程序（两步法或三步法）进行qPCR反应：

两步法反应程序

反应步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}$ C	3 min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	10 sec	} 40
退火&延伸	60 $^{\circ}$ C	30 sec	
溶解曲线	使用仪器默认设置		1

三步法反应程序

反应步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 °C	3 min	1
变性	95 °C	10 sec	} 40
退火	55-65 °C	10 sec	
延伸	72 °C	30 sec	
熔解曲线	使用仪器默认设置		1

- a. 请根据引物的Tm以及目的基因的长度调整退火（退火 & 延伸）的温度和时间；
- b. 需要提高特异性，可选两步法扩增；需要提高扩增效率，可选三步法进行扩增；
- c. 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采集程序。

07 引物设计

- ① 引物长度：18-25 bp；
- ② 扩增产物：长度建议控制在80-200 bp之间，150 bp为佳；
- ③ 碱基：GC 含量在 40%~60%；四种碱基整体分布要均匀，避免出现连续的 4 个相同碱基；3' 端最后一个碱基最好是 G 或者 C；
- ④ Tm：建议控制在58~62°C，正反向引物的 Tm 值相差不超过 1°C；
- ⑤ 引物内部或者两条引物之间尽量避免出现互补序列；
- ⑥ 设计好的引物可使用NCBI BLAST 功能检索确认特异性。

08 常见问题与解决方案

08-1 扩增曲线异常

- ① 曲线不光滑：信号太弱，确保 Mix 中预混的染料未降解，提高模板浓度重复实验；
- ② 断裂或下滑：模板浓度高，基线的终点值大于 C_t 值。减小基线终点(C_t 值-4)，重新分析数据；
- ③ 个别曲线突然骤降：管内有气泡；混匀时不要涡旋振荡，加样完毕注意轻弹管壁或者离心，以去除气泡；

08-2 无扩增曲线

- ① 循环数少：通常设置为40，过多的循环数会增加背景信号，降低可信度；
- ② 未设置荧光采集步骤或设置错误：荧光信号采集通常设置在退火延伸阶段（两步法），或72°C延伸阶段（三步法）；
- ③ 引物降解：若引物长期未用，应先使用PAGE 电泳检测其完整性；
- ④ 模板浓度低或降解：减少稀释倍数或重新制备模板，重复实验。

08-3 C_T 值偏大

- ① 扩增效率低：重新设计引物；提高引物浓度；使用三步法扩增；
- ② 模板浓度低或降解：减少稀释倍数或重新制备模板，重复实验；
- ③ 扩增产物太长：建议长度范围控制在80-200 bp；
- ④ PCR抑制剂：通常由模板带入，稀释或者重新制备高纯度的模板，重复实验。

08-4 空白对照(NTC)出现信号

- ① 反应体系被污染：更换新的Mix、水或者引物进行重复实验，反应体系需在超净工作台内配制，降低气溶胶污染的机率；
- ② 引物二聚体：35 个循环后，空白对照出现扩增属正常情况，可配合熔解曲线进行分析。

08-5 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引物；
- ② 引物浓度高：建议适当降低引物浓度；
- ③ cDNA模板有基因组污染：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。

08-6 重复性差

- ① 加样误差：使用更为精准的移液枪以及高品质枪头；对模板进行高倍稀释，增加模板加入体积，减少加样误差；放大 qPCR 反应体积；
- ② 模板浓度过低：减少模板稀释倍数，重复实验；
- ③ qPCR仪不同位置的温控不同：定期对仪器进行校准。

08-7 标准曲线线性关系不好

- ① 加样误差：对模板进行高倍稀释，增加模板加入体积；
- ② 模板浓度过低：减少模板稀释倍数，重复实验；
- ③ 标准样品降解：重新制备标准样品，重复实验。



Swiss Affinibody LifeScience AG

网址: www.affinibody.com

邮箱: info@affinibody.com

电话: +41(0)763290285 +86 15902760422

