

## 2×Universal SYBR Green qPCR Mix 说明书

### 产品组成

2×Universal SYBR Green qPCR Mix	1 ml	5 ml
Cat. No.	7116100	7116500
2×Universal SYBR Green qPCR Mix*	1 ml	1 ml×5
ddH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml×5
说明书	1 份	1 份

\* 含有 Universal ROX Reference Dye, 适配于各种类型的 qPCR 仪器, 无需根据仪器专门调整 ROX 的浓度。

### 产品储存与有效期

- 20℃避光保存, 有效期 2 年。

### 技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部: e-mail: technical@simgen.cn, 电话: 400-0099-857。

### 产品介绍

本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂, 主要用于基因组 DNA 靶序列和 RNA 反转录后 cDNA 靶序列的检测, 可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线, 快速、准确的对靶基因进行检测、定量, 特异性强, 重复性好, 可信度高。所含的荧光染料 SYBR Green I 可以与所有的双链 DNA 结合, 使该产品可用于不同靶序列的检测而不需合成特异性标记探针。本产品是一种 2×浓度的预混合液, 只需取 0.5 倍 PCR 体系体积的 2×Universal SYBR Green qPCR Mix, 加入引物和模板, 以 ddH<sub>2</sub>O 补足体积即可。

产品使用了抗体修饰的热启动 Taq DNA Polymerase, 在常温下没有聚合酶活性, 有效避免在常温条件下由引物和模板非特异性结合或引物二聚体而产生的非特异性扩增。独特的 PCR 缓冲体系与热启动酶的组合, 以及产品中含有的 PCR 增强剂和蛋白稳定剂, 最大限度地提高 PCR 的扩增效率和特异性, 可进行高灵敏度、高精度的 Real Time PCR 扩增反应。本产品中含有特殊的 ROX Reference Dye, 适配于各种类型的 qPCR 仪器, 无需根据仪器专门调整 ROX 的浓度。

### 用户需自备的试剂和物品

1. PCR 引物
2. DNA 或 cDNA 模板。
3. 适用于荧光定量 PCR 的单管、8 联排管、或 96 孔 PCR 管(板)。
4. 微量移液器和洁净枪头。
5. Real time PCR 扩增仪 (授权仪器)。

### 注意事项

1. 使用前请上下颠倒轻轻混匀, 勿涡旋振荡混匀, 尽量避免起泡, 并经短暂离心后使用。
2. 2×Universal SYBR Green qPCR Mix 解冻后可能会有白色或淡黄色的沉淀, 可于室温短时间避光放置, 轻柔上下颠倒混匀直至沉淀全部消失。沉淀会导致溶液成分不均匀, 使用前务必充分混匀试剂。
3. 本产品中含有 SYBR Green I 荧光染料和 ROX 染料, 保存本产品或配制 PCR 反应液时应避免强光照射。
4. 避免反复冻融本产品, 反复冻融可能使产品性能下降。
5. 本产品不能用于探针法荧光定量 PCR。
6. 配制反应液时, 请使用洁净的吸头 (推荐使用带滤芯的吸头) 和离心管, 尽量防止污染。
7. 配制反应液时, 试剂请于冰上放置。

## 操作方法

### 1. 按下列组份配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）

试剂	使用量	使用量	终浓度
2×Universal SYBR Green qPCR Mix	10.0 μl	25.0 μl	1×
Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	1.0 μl	0.2 μM <sup>*1</sup>
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl	1.0 μl	0.2 μM <sup>*1</sup>
DNA 模板	x μl <sup>*2</sup>	x μl <sup>*2</sup>	
ddH <sub>2</sub> O	(9.2 - x) μl	(23 - x) μl	
Total	20.0 μl <sup>*3</sup>	50.0 μl <sup>*3</sup>	

\*1 通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μM 范围内调整引物浓度。

\*2 在 20 μl 反应体系中，DNA 模板的添加量通常在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的 DNA 模板添加量。若模板为未稀释的 cDNA 原液，使用体积不应超过反应总体积的 1/10。

\*3 按照各仪器推荐体系进行反应液配制。

### 2. 进行 Real Time PCR 反应

PCR 反应管用离心机低速离心数秒后放入 PCR 仪中进行 Real Time PCR 反应。建议采用下表的两步法 PCR 反应程序，如果该程序得不到良好的实验结果，再进行 PCR 条件的优化。由于使用 T<sub>m</sub> 值较低的引物等原因，两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

阶段	循环数	温度	时间	内容	荧光信号采集
Stage 1	1	95°C	30 秒 <sup>*1</sup>	预变性	否
Stage 2	40	95°C	5~10 秒 <sup>*2</sup>	变性	否
		60°C <sup>*3</sup>	20~30 秒 <sup>*4</sup>	退火+延伸	是
Stage 3	熔解曲线分析 (Melt Curve/Melting/Dissociation Curve Stage) <sup>*5</sup>				

\*1 本产品中使用的是含 Taq 酶抗体的 Hot Start Taq DNA Polymerase，不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。

如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。因此在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、30 秒。若模板结构复杂，可将预变性时间延长至 2~3 分钟以提高预变性效果。

\*2 变性时间在 5~10 秒内均可，请根据不同型号仪器的使用要求进行时间设定。

\*3 退火温度：若要提高反应特异性，可提高退火温度，以 60~64°C 作为设定范围的参考。若因使用的引物 T<sub>m</sub> 值较低等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法 PCR 扩增，三步法的退火温度请以 55~64°C 的范围作为设定参考。

\*4 退火+延伸时间在 20~30 秒内均可，请根据使用的仪器所需要的数据采集最短时间限制自行进行调整（例如：使用 ABI 7700 和 7900HT 时至少需要 30 sec；使用 ABI 7000 和 7300 时至少需要 31 sec）。若要提高扩增效率，可尝试将延伸时间增加至 1 分钟，或尝试三步法 PCR。

\*5 使用仪器默认的熔解曲线采集程序。

### 3. 实验结果分析

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。分析方法参见仪器的操作手册。

## 常见问题分析

### 1. 无 CT 值（信号）出现

- ① 模板量不足或模板降解。对未知浓度的样品应从梯度稀释样本的最高浓度做起，并避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。
- ② 引物降解。可通过 PAGE 电泳检测其完整性。
- ③ 反应程序未设置或错误设置信号采集步骤。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。

### 2. 阴性对照也出现明显的扩增曲线

- ① 试剂或环境被污染。更换新的 Mix、ddH<sub>2</sub>O、引物重复实验。不要在加样区打开反应结束的 PCR 管。
- ② 引物二聚体的出现。SYBR Green 法荧光 PCR 在 35 cycles 以后阴性出现扩增曲线属正常情况，配合熔解曲线分析一般可确认不是目的基因的扩增。若是 30 cycles 之前阴性出现扩增曲线，说明有较严重的引物二聚体产生，应重新设计合适的引物。

### 3. 熔解曲线出现多峰

- ① 引物设计不够优化。应避免引物二聚体和发夹结构的出现。
- ② 引物浓度太高。适当降低引物的浓度，并注意上下游引物的浓度配比。
- ③ cDNA 模板有基因组的污染。RNA 提取过程中避免 DNA 的引入或使用有基因组 DNA 去除步骤的反转录试剂盒（Simgen Cat. No. 7306100/7316100），或通过引物设计避免非特异性扩增。

### 4. 实验重复性不好

- ① 加样不准确。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 仪器在样品上温度条件有差异，即温度均一性不好。定期校准仪器；尽量将样品放在仪器中间位置，避免边缘效应。
- ③ 模板浓度低。样品初始浓度越低，重复性越差，应减少样品的稀释倍数。

### 5. 扩增效率低

- ① 模板量不足或模板降解。对未知浓度的样品应从梯度稀释样本的最高浓度做起，并避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。
- ② 反应条件不够优化。可适当降低退火温度或改为三步法扩增。
- ③ 反应体系中有 PCR 反应抑制物。一般是加入模板时所引入，应先把模板适度稀释，再加入反应体系中，减少抑制物的影响。

### 6. 扩增曲线异常

- ① 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统矫正后产生。提高模板用量重复实验。
- ② 扩增曲线断裂或下滑：模板量过多。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；或将模板稀释 100~1000 倍后重复实验。

### 7. 扩增曲线的荧光值忽然变低

- ① Mix 反复冻融或受到强光照射，其中的 SYBR Green I 分解严重。
- ② 仪器盖子未关紧。注意检查仪器是否盖紧。
- ③ 卤钨灯（halogen lamp）使用过度，影响荧光采集。建议更换卤钨灯。
- ④ 配置反应体系时未将 Mix 混匀以致成分不均匀。

### 8. 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 模板浓度太高。提高模板稀释倍数。
- ③ 模板降解或浓度太低。建议重新制备模板。
- ④ 可能有模板 DNA 污染或扩增产物污染。建议更换试剂、清洁环境或重新制备 cDNA 模板。