

# F488 SYBR qPCR Mix (Universal)

REF: EG23111L

## 储运条件

长期保存请于 -20℃ 避光保存，Mix 融解后可在 4℃ 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 L    |
|--------------------------------|---------|
| F488 SYBR qPCR Mix (Universal) | 25×1 ml |

## 产品简介

F488 SYBR qPCR Mix (Universal) 是 SYBR Green I 嵌合染料法专用 qPCR 试剂，为 2× 预混液，包含除引物和 DNA 样品以外的所有 qPCR 组分。本产品核心组分是经过升级改造的热启动 Taq DNA 聚合酶，特异性更好。配合精心优化的 Buffer 体系，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。

本产品中含有通用校正染料，与绝大多数荧光定量 PCR 仪兼容，包括需要 ROX 校正的仪器，实验操作过程中不需要额外添加校正染料。

## 使用方法

### 1. 使用注意

- 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；
- 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；
- 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             |
|---------------------------|----------|-----------------|
| F488 SYBR qPCR Mix        | 10 μl    | 1×              |
| 正向引物 (10 μM) <sup>a</sup> | 0.4 μl   | 0.2 μM          |
| 反向引物 (10 μM) <sup>a</sup> | 0.4 μl   | 0.2 μM          |
| DNA 模板 <sup>b</sup>       | X μl     | 10~200 ng/20 μl |
| 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      | 30~60 s |
| 变性                   | 95 °C      | 10 s    |
| 退火 & 延伸 <sup>a</sup> | 60 °C      | 30 s    |
| 熔解曲线 <sup>b</sup>    | 使用仪器默认采集程序 |         |

40 Cycles

### 三步法

| 步骤                | 温度         | 时间      |
|-------------------|------------|---------|
| 预变性               | 95 °C      | 30~60 s |
| 变性                | 95 °C      | 10 s    |
| 退火 <sup>a</sup>   | 55~65 °C   | 10 s    |
| 延伸 <sup>a</sup>   | 72 °C      | 30 s    |
| 熔解曲线 <sup>b</sup> | 使用仪器默认采集程序 |         |

40 Cycles

a. 根据引物的 T<sub>m</sub> 值进行退火（退火 & 延伸）温度的设定；若扩增片段在 200 bp 以内，延伸（退火 & 延伸）时间可以设置为 15 s；此外，延伸时间的设置还需根据您使用的 qPCR 仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整；

b. 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，则需要对反应条件进行优化，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

- 扩增产物长度建议控制在 80~200 bp；
- 引物长度为 18~25 bp；
- 正向引物和反向引物的 T<sub>m</sub> 值相差不超过 1℃ 为佳，T<sub>m</sub> 值控制在 58~62℃ 为佳；
- 引物的 GC 含量控制在 40%~60% 之间；
- 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）；
- 引物 3' 端最后一个碱基最好为 G 或者 C；
- 避开引物内部或者两条引物之间的互补序列；
- 使用 NCBI BLAST 功能检索确认引物的特异性。

## 常见问题

| 问题描述        | 可能原因                 | 解决办法   |
|-------------|----------------------|--|
| 扩增曲线不光滑     | 荧光信号太弱，经系统校正后产生      | 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                                 |
| 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  |
| 个别孔扩增曲线突然骤降 | 反应管内留有气泡             | 确保 Mix 完全溶解，请勿涡旋振荡混匀<br>加样完成后轻弹离心去除气泡<br>延长预变性时间至 10 min，以去除气泡         |
| 反应结束无扩增曲线出现 | 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  |
|             | 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                 |
|             | 引物可能降解               | 长期未用的引物，应先通过 PAGE 电泳检测完整性，以排除其降解的可能                                    |
|             | 模板浓度过低               | 减少模板稀释倍数重复实验，样品浓度未知的情况下先从最高浓度做起  |
|             | 模板降解                 | 重新制备模板，重复实验  |
| Ct 值出现过晚    | 扩增效率低                | 提高引物浓度，尝试三步法扩增程序，或者重新设计引物  |
|             | 模板浓度过低               | 减少模板稀释倍数重复实验，样品浓度未知的情况下先从最高浓度做起  |
|             | 模板降解                 | 重新制备模板，重复实验  |
|             | 扩增产物过长               | 扩增产物长度控制在 80~200 bp  |
|             | 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重新制备纯度高的模板重复实验  |
| 空白对照出现信号    | 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，继续更换引物、吸头、PCR 管或启用新的 Mix<br>反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染 |
|             | 出现引物二聚体等非特异性扩增       | 一般在 35 循环以后空白对照出现扩增产物属正常情况，应配合熔解曲线进行分析<br>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    | 引物设计不佳               | 根据引物设计原则重新设计新引物  |
|             | 引物浓度过高               | 适当降低引物浓度   |
|             | 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，例如：dsDNase，以去除基因组污染，或设计跨内含子引物                  |
| 实验重复性差      | 加样误差大                | 使用精准的移液器、配合高品质吸头准确移液<br>高倍稀释模板，加入大体积模板减少加样误差<br>放大 qPCR 反应体积           |
|             | 模板浓度过低               | 减少模板稀释倍数重复实验   |
|             | qPCR 仪不同位置的温度偏差      | 定期校准 qPCR 仪  |