

2×Universal Blue SuperGreen qPCR MasterMix

产品信息

| 产品名称 | 产品编号 | 规格 |
|--|---------|-------|
| 2×Universal Blue SuperGreen qPCR MasterMix | DY20305 | 5×1mL |

产品描述

本制品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的 2×预混液。已经将 DNA 聚合酶、dNTP、特殊稳定剂、优化的反应缓冲液、BSA 和 SYBR Green I 等试剂预混，使用时只需加入模板、引物和水，可减少操作步骤，缩短加样时间，降低污染几率，具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。预混液中添加了染料，便于区分加样情况。

本制品的核心组分是抗体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶，配合精心优化 Buffer 体系，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，可在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对目的基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。

保存方式

-20 °C 避光储存，有效期 12 个月。

避免反复冻融。可在 4 °C 避光条件下稳定存放 1 个月。

注意事项

1. 本制品是通用型 mix，适用于所有定量 PCR 仪器。
2. 本制品含 SYBR Green I，在强光下易分解，导致灵敏度降低，使用时请避免长时间强光照射。
3. 为提高扩增特异性，减少背景，建议在冰上配制 PCR 反应液，再放入仪器中扩增。
4. 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。
5. 推荐的引物终浓度为 0.2 μM，可在 0.1~1 μM 范围内优化。

建议反应体系（反应液配制请在冰上进行）

| 组分 | 体积 (50 μL) | 体积 (20 μL) |
|--|------------|------------|
| 2×Universal Blue SuperGreen qPCR MasterMix | 25 μL | 10 μL |
| 上游引物 (10 μM) | 1 μL | 0.4 μL |
| 下游引物 (10 μM) | 1 μL | 0.4 μL |
| Template DNA | X μL | X μL |
| ddH ₂ O | 补足至 50 μL | 补足至 20 μL |

反应体系中各组分可以根据如下原则进行调整：

- 1) 一般来说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。当反应性能比较差时，可以在终浓度 0.1 ~ 1 μM 范围内调整引物浓度。
- 2) qPCR 灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。
- 3) 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。cDNA 原液建议 5-10 倍稀释，最佳

模版量以扩增得到的 CT 值在 20-30 左右。

qPCR 反应程序 (可根据机型适当调整)

1) 两步法

| | | | | |
|---------|-------------------|----------|--------------------|--------|
| Stage 1 | 预变性 | Reps: 1 | 95 °C | 30 sec |
| Stage 2 | 循环反应 | Reps: 40 | 95 °C | 10 sec |
| | | | 60 °C ^a | 30 sec |
| Stage 3 | 溶解曲线 ^b | Reps: 1 | 仪器默认设置 | |

2) 三步法

| | | | | |
|---------|-------------------|----------|-----------------------|--------|
| Stage 1 | 预变性 | Reps: 1 | 95 °C | 30 sec |
| Stage 2 | 循环反应 | Reps: 40 | 95 °C | 10 sec |
| | | | 55-65 °C ^a | 10 sec |
| | | | 72 °C ^a | 30sec |
| Stage 3 | 溶解曲线 ^b | Reps: 1 | 仪器默认设置 | |

a. 根据引物的 T_m 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 sec。此外, 延伸时间的设置还需根据qPCR仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整。

b. 不同仪器的溶解曲线采集程序有所差别, 一般可使用仪器默认的溶解曲线采集程序。

实验优化

若使用默认反应条件反应性能不佳时, 则需要进行反应条件的优化, 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。

引物设计指南

1. 扩增产物长度建议控制在 80~200 bp, 引物长度为 18~25 bp。
2. 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。
3. 引物的 GC 含量控制在 40%~60%之间。引物 3'端最后一个碱基最好为 G 或者 C。
4. 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)。
5. 避开引物内部或者两条引物之间的互补序列。
6. 使用 NCBI BLAST 功能检索确认引物的特异性。

本产品仅作科研用途