**Taq SYBR® Green qPCR Premix (None/Low/High ROX & Universal)**

REF: MP008/MP009/MP010/MP023

**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** | **MP008M** | **MP009M** | **MP010M** | **MP023M** |
| Taq SYBR® Green qPCR Premix (None ROX)  | 5×1ml | \_ | \_ | \_ |
| Taq SYBR® Green qPCR Premix (Low ROX)  | \_ | 5×1ml | \_ | \_ |
| Taq SYBR® Green qPCR Premix (High ROX) | \_ | \_ | 5×1ml | \_ |
| Taq SYBR® Green qPCR Premix (Universal) | \_ | \_ | \_ | 5×1ml |

**产品简介**

Taq SYBR® Green qPCR Premix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，可减少操作步骤，缩短加样时间，降低污染几率。其核心组分是经抗体修饰的热启动Taq DNA聚合酶，配合精心优化的Buffer体系以及PCR反应促进因子，是产品具有特异性强、扩增效率高等特点，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。

**使用方法**

**1. 适用机型**

|  |  |
| --- | --- |
| **产品** | **适用机型** |
| MP008 (None ROX) | Bio-Rad CFX 全系列；Roche LightCycler™ 系列；Eppendorf Mastercycler® ep realplex 系列；Qiagen/Corbett Rotor-Gene® 系列；Takara Thermal Cycler Dice；analytikjena qTOWER系列等 |
| MP009 (Low ROX) | ABI 7500/7500 Fast，ABI ViiA 7™；ABI QuantStudio™ 系列；Stratagene Mx3000P®/3005P™/4000™ |
| MP010 (High ROX) | ABI 7000/7300/7700/7900 HT/7900 HT Fast，StepOne™，StepOne Plus™等 |
| MP023（Universal） | 全机型通用 |

1. **使用注意**

① 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；

② 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。

**3. 建议的qPCR反应体系**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **试剂** | **使用量** | **终浓度** |
| Taq SYBR® Green qPCR Premix | 10μl | 1× |
| 正向引物 (10 μM)a | 0.4 μl | 0.2 μM |
| 反向引物 (10 μM)a | 0.4 μl | 0.2 μM |
| DNA 模板 b | X μl | 10~200ng/20 μl |
| Nuclease-Free Water | To 20 μl |

a.通常推荐的引物终浓度为0.2uM，反应效果不佳时可0.1~1μM范围内进行调整；

b.推荐模板加样量为1~2μl，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。

**4. qPCR反应程序（可根据机型适当调整）**

**两步法**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **步骤**  | **温度** | **时间**  |
| 预变形 | 95 ℃ | 30 sec |
| 变形 | 95 ℃ | 10 sec 40 个循环 |
| 退火&延伸a | 60℃ | 30 sec  |
| 熔解曲线b | 使用仪器默认采集程序 |

**三步法**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **步骤**  | **温度** | **时间**  |
| 预变形 | 95 ℃ | 30 sec  |
| 变形 | 95 ℃ | 10 sec  |
| 退火a | 55~65 ℃ | 10 sec 40 个循环 |
| 延伸a | 72℃ | 30 sec  |
| 熔解曲线b | 使用仪器默认采集程序 |

a.根据引物的Tm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。

1. **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0.1～1.0μM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。

1. **引物设计原则**

① 扩增产物长度建议控制在 80～200 bp

② 引物长度为 18～25 bp；

③ 正向引物和反向引物的Tm 值相差不超过 1 ℃为佳，Tm 值控制在 58～62℃为佳；

④ 引物的 GC 含量控制在 40%～60% 之间；

⑤ 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）；

⑥ 引物 3' 端最后一个碱基最好为 G 或者 C；

⑦ 避开引物内部或者两条引物之间的互补序列；

⑧ 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 Cq 值 | 减小基线终点 (Cq 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；加样完成后轻弹离心去除气泡；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℃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 |
| Cq 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；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 | 一般在分析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 | 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 |
| 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；高倍稀释模板，加入大体积模板减少加样误差；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 |