



## 2×高特异性通用染料法qPCR预混液（含示踪剂）说明书

货号：WGD-X-3100126

### 产品介绍

本产品是使用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 反应的专用预混液，颜色为淡蓝色，便于加样。核心组分 Taq DNA Polymerase 为一种高性能 DNA 聚合酶，配以针对 qPCR 优化的最适反应缓冲液，非常适合于进行高特异性、高灵敏度的 qPCR 反应。产品中含有特殊的 ROX Reference Dye，适用于所有 qPCR 仪器，无需在不同仪器上调整 ROX 的浓度。本产品为浓度 2× 的预混液，使用时只需添加引物和模板，使预混液工作浓度为 1× 即可。

### 产品目录

| 产品名称                       | 规格       |
|----------------------------|----------|
| 2×高特异性通用染料法 qPCR 预混液（含示踪剂） | 500 rxns |

### 产品组成

| 组分                         | 500 rxns |
|----------------------------|----------|
| 2×高特异性通用染料法 qPCR 预混液（含示踪剂） | 1 mL × 5 |

### 产品用途

本产品适用于 SYBR Green 染料法检测及分析的荧光定量实验，兼容各种荧光定量 PCR 仪。

### 产品特点

- 1. 一管预混操作方便；
- 2. 高灵敏度、高特异性；
- 3. 适用多种物种来源 DNA 检测。

### 注意事项

- 1. 本产品避免反复冻融，以免酶活下降。如每次使量较少，推荐少量分装使用；
- 2. 使用前请上下颠倒以混匀预混液，请勿漩涡混匀以免产过多泡引起反应体系体积失准，影响定量结果；
- 3. 由于本品中含有荧光染料 SYBR Green I，因此无论保存预混液还是配制反应体系时都应该尽量避免强光照射；
- 4. 本品灵敏度极高，即使空中微量的 DNA 气溶胶都能引起污染，导致实验失败。配制反应体系时请于超净工作台内进行，配制过程中请使用无菌无酶枪头、反应管，条件允许的实验室推荐使用专用的移液器、带滤芯的枪头，避免交叉污染；
- 5. 仪器类型不同，熔解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。

### 操作步骤

- 1. 推荐 qPCR 体系

| 组分                         | 体积     | 终浓度    |
|----------------------------|--------|--------|
| 2×高特异性通用染料法 qPCR 预混液（含示踪剂） | 10 μL  | 1×     |
| 正向引物（10 μM）                | 0.4 μL | 0.2 μM |
| 反向引物（10 μM）                | 0.4 μL | 0.2 μM |



|                    |                  |   |
|--------------------|------------------|---|
| 模板                 | X $\mu$ L        | - |
| ddH <sub>2</sub> O | Up to 20 $\mu$ L | - |

注：

- (1) 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 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 ~ 1.0  $\mu$ M 范围内调整引物浓度；
- (2) 模板 DNA 用量因模板溶液中存在的靶基因的拷数不同，可进行模板梯度稀释预试验得到合适的量，模板量建议不超过 100 ng；
- (3) 若以未稀释的 cDNA 原液为模板时，模板总量应不超过 qPCR 反应总体系的 1/10。

2. 推荐 qPCR 反应条件

| 阶段  | 温度   | 时间        | 循环数      |
|-----|------|-----------|----------|
| 预变性 | 95 ℃ | 5 min     | 1 cycle  |
| 循环段 | 95 ℃ | 10 s      | 40 cycle |
|     | 60 ℃ | 10 ~ 30 s | 60℃采集荧光  |
| 熔解段 | 仪器默认 |           |          |

注：

- (1) 如需提高扩增特异性可提高退火温度；
- (2) 如需提高扩增效率可以延长延伸时间或循环段采用三步法。

■ 储存及运输条件

-25 ~ -15  $^{\circ}$ C 避光保存，保质期 12 个月。冰袋运输。

■ 常见问题及解决方法

| 常见问题      | 可能原因                            | 解决方案                                         |
|-----------|---------------------------------|----------------------------------------------|
| 无 Ct 值或偏大 | 模板浓度过低或降解。                      | 适当增加模板量，检查模板是否降解，使用新鲜制备的模板。                  |
|           | 模板纯度质低，蛋白质、盐等杂质会影响 PCR 扩增和荧光检测。 | 重新制备高质量的模板或对模板进稀释，降低杂质浓度。                    |
|           | 引物扩增效率低。                        | 重新设计高质量引物。                                   |
|           | 反应循环数不够。                        | 循环数一般设置为 40。                                 |
|           | qPCR 体系污染。                      | 使用 RNase/DNase-free 耗材。                      |
| Ct 值重复性差  | 存在引物二聚体。                        | 进行熔解曲线分析，结合浓度梯度琼脂糖凝胶电泳辅助判断是否为二聚体，若是则需重新设计引物。 |
|           | 加样误差。                           | 使用优质耗材与移液器，避免加样挂壁，模板浓度不宜过高。                  |
|           | 仪器误差。                           | 选择适用仪器，定期校准。                                 |
| 熔解曲线多峰    | 存在引物二聚体。                        | 进行熔解曲线分析，结合浓度梯度琼脂糖凝胶电泳辅助判断是否为二聚体，若是则需重新设计引物。 |
|           | 非特异性扩增。                         | 重新设计引物。                                      |
|           | 基因组污染。                          | 去除基因组 DNA，或跨内含子设计引物。                         |



|            |                            |         |
|------------|----------------------------|---------|
| 熔解曲线单峰但峰不尖 | 存在大小相近的非特异性扩增，起峰、落峰温度跨度较大。 | 重新设计引物。 |
|------------|----------------------------|---------|

