**SiDoTek™ 2×Blue Universal SYBR qPCR Master Mix**

**2×蓝色通用SYBR Green qPCR 预混液**

**目录号：SDMR3-2a**

**储存条件：-30 ~ -15℃避光保存2年，≤0℃避光运输**

**产品内容：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **组分** | **规格**  **SDMR3-1a** | **规格**  **SDMR3-2a** |
| 2× Blue Universal SYBR qPCR Master Mix | 1 mL | 5×1 mL |
| DNase-free Water | 1 mL | 5×1 mL |

**产品简介**

2× Blue Universal SYBR qPCR Master Mix是使用SYBR Green I 嵌合荧光法进行qPCR的2×试剂，颜色为蓝色，具有加样示踪的作用。其核心组分Taq DNA Polymerase是基于抗体法封闭的热启动DNA聚合酶，可以有效抑制低温条件下的非特异性扩增，同时配以针对qPCR优化的反应Buffer体系，非常适合用于高特异性、高灵敏度的qPCR检测反应，可以在较宽的定量区域内得到良好的标准曲线，从而实现对靶基因的实时检测定量准确、重复性好、可信度高。本品主要成分包括化学修饰的Hot Start Fast Taq DNA Polymerase、dNTP、Mg**2+**、SYBR Green I和针对qPCR优化的最适Buffer。另外，预混液体系中添加了特殊ROX Reference Dye，适用于不同品牌的qPCR 仪器。本产品使用便捷省时，配制反应体系时只需加入引物和模板即可扩增。

**注意事项**

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

2. 请于使用前确保产品完全解冻，彻底混匀后短暂离心，置于冰上备用，建议全程冰上操作。

3. 反复冻融会影响产品性能，解冻后尽量在一个月内使用完毕。

4. 本产品中含荧光染料SYBR Green I，使用中需注意避光操作。

5. 试剂使用前请上下轻轻颠倒混匀，请勿涡旋振荡混匀，避免产生气泡。

6. 反应液的配制、分装请使用新的一次性枪头，尽量避免样品间的交叉污染。

**实验流程**

**推荐体系：**

1. 按照下表配置PCR反应体系（注：配置多个反应孔时，请为各组分预留10%的余量，以免移液损失。）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **试剂组份** | **20μL体系** | **50μL体系** |
| 2× Blue Universal SYBR qPCR Master Mix | 10 μL | 25 μL |
| Forward Primer (10μM) | 0.4 μL\* | 1 μL\* |
| Reverse Primer (10μM) | 0.4 μL\* | 1 μL\* |
| 模板DNA/cDNA | X μL\* | X μL\* |
| DNase-free Water | **Up to 20 μL** | **Up to 50 μL** |

**\*通常每条引物终浓度为0.2 μM，也可根据情况在0.1~0.4μM 间进行调整。**

**\*微量体积加样时误差大，建议批量配制反应体系后分装至八联排管中，再将cDNA模板稀释后加入对应的反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性；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。**

2. 反应体系配好加入模板后，盖好八联排管盖，充分涡旋混匀，离心，避免产生气泡。全程操作需佩戴手套，尽量避免手指按压管盖中心位置。

**两步法反应程序设置参考如下：**

**标准程序**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Stage** | **步骤** | **温度** | **时间** | **循环数** |
| Stage 1 | 预变性/酶激活 | 95 ℃ | 5 min | 1 |
| Stage 2 | 变性 | 95 ℃ | 15 sec | 40 |
| 退火/延伸/采集信号 | 60 ℃ | 40 sec\* |
| Stage 3 | 熔解曲线 | 仪器默认设置 | | 1 |

**快速程序**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Stage** | **步骤** | **温度** | **时间** | **循环数** |
| Stage 1 | 预变性/酶激活 | 95 ℃ | 5 min | 1 |
| Stage 2 | 变性 | 95 ℃ | 2 sec | 40 |
| 退火/延伸/采集信号 | 60 ℃ | 20 sec\* |
| Stage 3 | 熔解曲线 | 仪器默认设置 | | 1 |

**\*延伸时间请根据您使用的Realtime qPCR仪数据采集最短时间限制以及PCR产物长度自行调整。**

**\*模板拷贝数较低时采用标准程序可提高数据的重现性。**

**三步法反应程序设置参考如下：**

**标准程序**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Stage** | **步骤** | **温度** | **时间** | **循环数** |
| Stage 1 | 预变性/酶激活 | 95 ℃ | 5 min | 1 |
| Stage 2 | 变性 | 95 ℃ | 15 sec | 40 |
| 退火  延伸/采集信号 | 55-65 ℃  72 ℃ | 10 sec  30 sec\* |
| Stage 3 | 熔解曲线 | 仪器默认设置 | | 1 |

**快速程序**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Stage** | **步骤** | **温度** | **时间** | **循环数** |
| Stage 1 | 预变性/酶激活 | 95 ℃ | 5 min | 1 |
| Stage 2 | 变性 | 95 ℃ | 15 sec | 40 |
| 退火  延伸/采集信号 | 55-65 ℃  72 ℃ | 10 sec  15 sec\* |
| Stage 3 | 熔解曲线 | 仪器默认设置 | | 1 |

**\*延伸时间请根据您使用的Real-time qPCR仪数据采集最短时间限制以及PCR产物长度自行调整。**

**\*模板拷贝数较低时采用标准程序可提高数据的重现性。**

**若需提高扩增特异性，可使用两步法程序或提高退火温度；若需提高扩增效率，可使用三步法程序或延长延伸时间。**

**结果分析注意事项**

定量检测至少需要三个生物学重复，反应结束后需要确认扩增曲线的线形，熔解曲线的峰形。

1. 扩增曲线：标准扩增曲线为S型。

Ct值小于10，需要将模板稀释后，重新进行实验（每稀释一倍，Ct值增大1）；

Ct值在30-35之间时，需要提高模板浓度，或者增大反应体系的体积，以提高扩增效率，确保结果分析的准确性；

Ct值大于35时，检测结果不可信。

2. 熔解曲线：

熔解曲线单峰，表明反应特异性好可以进行定量结果分析。反之，若熔解曲线出现明显双峰或者多峰，则不能进行定量分析，需要重新设计引物。

**常见问题与解决方案**

►扩增曲线形状异常

①扩增曲线不光滑：使用的八联排管或PCR板可能与设备不匹配，设备光源可能松动。

②扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡造成。样本离心后上机检测前务必仔细检查反应管内是否有气泡残留。

►反应结束无扩增曲线出现

①循环数不够：一般设置为40个循环。

②确认程序中是否设置了信号采集步骤。

③确认引物、模板是否降解。

►阴性对照出现扩增

①反应体系污染：更换新的Mix、水、引物重复实验。在超净工作台进行反应体系配置，减少气溶胶污染。

②产生引物二聚体，配合溶解曲线进行分析。

③使用含UDG/dUTP 防污染体系的扩增试剂。

►实验重复性差

①加样体积失准：建议使用大体积加样以减少误差。

②模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，减少模板稀释倍数或增加加入的模板体积。

③反应体系未充分混匀：上机检测前将反应体系充分混匀后离心再上机。