

Bonacy qPCR SYBR Green Fast Mix(Universal)

货号

SQ611

产品组成

| 组分 | 规格 |
|---|-----------|
| 2 ×Bonacy qPCR SYBR Green Fast Mix(Universal) | 5 ×1.0 mL |

保存条件

-20℃避光保存 12 个月。

产品简介

本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 反应的专用试剂。产品中包含抗体修饰的新型热启动 Bonacy DNA polymerase 和精心优化的 Buffer，能有效抑制低温下的非特异性扩增，大大提高了反应特异性和扩增效率，能够在更宽广的范围内进行准确定量。此外，本产品含有独特的校正染料，与一系列 qPCR 仪器兼容，包括需要 ROX 校正的仪器，实验过程中无需额外添加染料来校正仪器。

产品特点

- 高特异性：采用抗体修饰的新型热启动 Bonacy DNA polymerase 和精心优化的 Buffer；
- 操作简便：2×预混液中包含有 qPCR 反应所需所有组分，只需加入模板、引物和水即可进行反应。

适用范围

本产品适用于试剂盒提取的基因组 DNA、cDNA、质粒 DNA 和λDNA 等样本的扩增定量。

注意事项

1. 使用前请充分溶解混匀，尽量避免反复冻融，以免酶活下降；
2. 本产品中含有 SYBR Green I，需避光保存，使用时尽量避免强光照射；
3. 为了避免气溶胶污染，建议使用核酸清洁剂对实验台面及操作环境进行清洁；
4. 为不影响后续实验，建议做预实验检查引物有效性和特异性；
5. 上机前，注意消除体系中的气泡，以免对结果造成影响。

本产品仅供科研使用

使用方法

操作示例

按下表配制 qPCR 反应体系（冰上配制）

| 组分 | 20 μL 体系 | 终浓度 |
|---|-------------|--------|
| 2 ×Bonacy qPCR SYBR Green Fast Mix(Universal) | 10 μL | 1 × |
| Primer 1 (10 μM) ^a | 0.4 μL | 0.2 μM |
| Primer 2 (10 μM) ^a | 0.4 μL | 0.2 μM |
| Template DNA ^b | As require | — |
| ddH ₂ O | Up to 20 μL | — |

- a. 引物终浓度推荐 0.4 μM，当反应性能较差时，可在终浓度 0.2~1.0 μM 范围内调整引物浓度。推荐引物长度 25 bp 左右、T_m 值 60℃~65℃为佳，GC 含量控制在 50%左右、3' 端最后一个碱基最好为 G 或 C，比对引物避免 3' 端或引物间有非特异性互补；
- b. 为保证扩增效率，建议将模板适当稀释后再进行 qPCR 反应。若模板为 cDNA 原液，则使用体积不超过 qPCR 反应总体积的 1/10，即 2 μL/20 μL 体系。

推荐的 qPCR 程序

● 两步法扩增程序

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|--------------------|-----|------|-----------|
| 预变性 | 95℃ | 30 s | 1 |
| 变性 | 95℃ | 10 s | 40 cycles |
| 退火/延伸 ^a | 60℃ | 30 s | |

● 三步法扩增程序（当模板浓度低或 qPCR 扩增效率低时可尝试）

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|-----------------|--------|------|-----------|
| 预变性 | 95℃ | 30 s | 1 |
| 变性 | 95℃ | 10 s | 40 cycles |
| 退火 ^a | 55~65℃ | 10 s | |
| 延伸 ^a | 72℃ | 30 s | |

注：熔解曲线使用仪器默认程序即可。

- a. 根据引物的 T_m 值进行退火/延伸（退火）温度的设定；若扩增片段在 200 bp 以内，退火/延伸（延伸）时间可以设置为 15 sec；此外，退火/延伸（延伸）时间的设置还需根据您使用的 qPCR 仪所需的最短数据采集时间自行调整。

本产品仅供科研使用

结果分析

1. **NTC (No Template Control, 无模板阴性对照)**：若 NTC 的 CT 值大于 35 或无 CT，则体系不存在污染；若 CT 值小于 35，则体系可能存在污染或引物不特异，形成引物二聚体，建议清洁实验环境、更换无菌水、检查引物是否污染，或适当降低引物浓度、优化引物设计。
2. **扩增曲线及 CT 值**：标准扩增曲线呈光滑的“S”型。一般情况下目的基因 Ct 值在 20~30 之间，内参 Ct 值在 15~20 之间。若 Ct 值较小，建议稀释模板；若 Ct 值较大，建议提高模板浓度或增大反应体系；若 Ct 值大于 35，检测结果无法定量分析基因的表达量，但可用于定性分析。
3. **熔解曲线**：标准熔解曲线呈单峰。若熔解曲线出现双峰或者多峰，可能存在污染、引物二聚体或非特异扩增，建议降低引物浓度或优化引物设计。

常见问题与解决办法

Q1: 无 Ct 值出现?

A1:

- 1) 采集荧光信号的步骤有误。检查程序设置，两步法扩增在退火延伸步骤采集信号，三步法扩增在延伸阶段采集信号；
- 2) 引物或模板降解。PAGE 电泳检测引物完整性，琼脂糖凝胶电泳检测模板 DNA 或 RNA 的质量及完整性，RNA 模板建议重新逆转录获得 cDNA，cDNA 应尽快使用；
- 3) 模板量不足。适当增加模板用量或重新制备高浓度模板。

Q2: 实验重复性差?

A2:

- 1) 加样存在误差。使用性能较好的移液枪，配制预混液后分装，减少移液误差；
- 2) 荧光定量 PCR 仪器不同位置温度控制不一致。定期校准仪器；
- 3) 模板浓度低或拷贝数低。适当增加模板用量。

Q3: 扩增曲线形状异常?

A3:

- 1) 扩增曲线不光滑。信号太弱，经系统校正后产生，可提高模板浓度重复实验；
- 2) 扩增曲线断裂、骤降。模板浓度较高或反应管内留有气泡，减小基线终点(CT 值-4)重新分析数据，或上机前离心并仔细检查反应管内是否有气泡残留。