

Taq Visual SYBR qPCR Premix (Universal)

REF: EG23115-M/L

储运条件

长期保存请于 -20°C 避光保存，解冻后可在 4°C 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 M	规格 L
Taq Visual SYBR qPCR Premix (Universal)	4×1.25 ml	20×1.25 ml
10× Dilution Buffer	1 ml	5×1 ml

产品简介

Taq Visual SYBR qPCR Premix (Universal) 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，特异性强、扩增效率高，可有效抑制非特异性扩增，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。本品已含有通用校正染料，与绝大多数 qPCR 设备兼容，不需要额外添加染料来校正仪器。

本品可利用不同染料混合后产生的变色效应，追踪移液过程，从而显著减少移液错误。Taq Visual SYBR qPCR Premix 中包含蓝色染料，10× Dilution Buffer 中包含黄色染料。当 Taq Visual SYBR qPCR Premix (蓝色) 中加入了用 Dilution Buffer 稀释的模板 (黄色) 后会产生蓝色 → 绿色的变色效应，从而可以根据液体颜色准确判断是否已加入模板。

使用方法

1. 模板稀释

使用过程中，如需要进行移液追踪，则根据下表选择合适的方式提前添加 Dilution Buffer 至模板中，然后进行 qPCR 检测；如不需要进行移液追踪，则不使用 Dilution Buffer 即可。

DNA 模板状态	10× Dilution Buffer 使用方式	模板中 Dilution Buffer 浓度
固体	使用 ddH ₂ O 将 10× Dilution Buffer 稀释至 1×，使用 1× Dilution Buffer 溶解 DNA	1 ×
溶液	如有必要，先使用 ddH ₂ O 将模板稀释至目标浓度，然后在每 9 μl 模板中加入 1 μl 10× Dilution Buffer	1 ×

注：如果 Dilution Buffer 使用不当，有可能影响 qPCR 结果。

2. 建议的 qPCR 反应体系

试剂	使用量	终浓度
Taq Visual SYBR qPCR Premix	10 μl	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	10~200 ng/20 μl
Nuclease-Free Water	To 20 μl	

a. 通常推荐的引物终浓度为 0.2 μM，可在 0.1~1 μM 范围内调整；

b. 如使用 Dilution Buffer 进行加样追踪，模板体积请勿超出 2~5 μl/20 μl reaction。如果模板用量低于 2 μl/20 μl reaction，会造成显色偏淡，影响追踪效果；如果模板用量高于 5 μl/20 μl reaction，Dilution Buffer 中的成分可能会干扰 qPCR 反应。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。

注：当模板类型为未稀释 cDNA 原液时，不论其是否包含 1× Dilution Buffer，使用体积均不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10，即 2 μl/20 μl reaction。

3. qPCR 反应程序 (可根据机型适当调整)

两步法

步骤	温度	时间
预变性	95°C	30 s
变性	95°C	10 s
退火 & 延伸 ^a	60°C	30 s
熔解曲线	使用仪器默认采集程序	

40 Cycles

三步法

步骤	温度	时间
预变性	95°C	30 s
变性	95°C	10 s
退火 ^a	55~65°C	10 s
延伸 ^a	72°C	30 s
熔解曲线	使用仪器默认采集程序	

40 Cycles

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 s；此外，退火 & 延伸 (延伸) 时间的设置还需根据您使用的 qPCR 仪所需要的最短数据采集时间自行调整。

4. 实验优化

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。

5. 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 两条 T_m 值相差不超过 1°C，T_m 值控制在 58~62°C；
- ④ 引物的 GC 含量控制在 40%~60%；
- 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)，3' 端最后一个碱基最好为 G 或者 C；
- ⑥ 避开引物内部或者两条引物之间的互补序列；
- ⑦ 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 Ct 值	减小基线终点 (Ct 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°C 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
Ct 值出现过早	模板降解	重新制备模板，重复实验
	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
空白对照出现信号	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
	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
熔解曲线出现多峰	出现引物二聚体等非特异性扩增	一般在 35 循环以后空白对照出现扩增产物属正常情况，应配合熔解曲线进行分析 重新设计引物，调整引物浓度或优化 PCR 反应程序
	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	cDNA 模板存在基因组污染	提取后的 RNA 溶液使用 DNA 酶进行消化，例如：dsDNase，以去除基因组污染，或设计跨内含子引物
	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