



GS AntiQ qPCR SYBR Green Fast Mix(Universal)

目录号

GS40100

产品组成

组分	规格
2 ×GS AntiQ qPCR SYBR Fast Mix(Universal)	5 × 1.0 mL

保存条件

-20°C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 GS AntiQ 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 GS AntiQ 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（目录号：GS70090）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。

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 μ L 体系	终浓度
2 \times GS AntiQ qPCR SYBR Fast Mix(Universal)	10 μ L	1 \times
Primer 1 (10 μ M) ^a	0.4 μ L	0.2 μ M
Primer 2 (10 μ M) ^a	0.4 μ L	0.2 μ M
Template DNA ^b	As require	-
ddH ₂ O	Up to 20 μ L	-

- 引物终浓度推荐 0.2 μ M，当反应性能较差时，可在终浓度 0.2~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。推荐引物长度 25 bp 左右、T_m 值 60°C~65°C 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；
- 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 μ L/20 μ L 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°C	30 s	1
变性	95°C	10 s	40 cycles
退火/延伸 ^a	60°C	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°C	30 s	1
变性	95°C	10 s	40 cycles
退火 ^a	55~65°C	10 s	
延伸 ^a	72°C	30 s	

注：熔解曲线使用仪器默认程序即可。

- 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 仪所需要的最短数据采集时间自行调整。

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, 经系统矫正后产生, 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。