BioTeke

核酸扩增试剂使用说明书

【产品名称】

产品通用名称：核酸扩增试剂

产品商用名称: **2×Plus SYBR real-time PCR mixture**

【包装规格】

PR7701（1 ml）/PR7702（5 ml）/PR7703（25 ml）/PR7704（50 ml）

【检验原理】

本产品是用于染料法（SYBR Green I）实时荧光定量的预混体系。产品含有优质抗体修饰的 HotStart Taq DNA Polymerase、dNTPs、Mg^{2+}、反应缓冲液和稳定剂等成分。主要用于基因组 DNA 靶序列和 RNA 反转录后 cDNA 靶序列的检测 ,如基因表达分析 ,拷贝数分析 ,SNP 基因型分析等，适用于不同类型荧光定量 PCR

本体系为 2×预混实时荧光定量 PCR 反应体系，使用时只需加入模板、引物和水，使其工作浓度为 1×,即可进行反应。具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点，可最大限度地减少人为误差、节约 PCR 实验操作时间、降低污染几率。

【主要组成成分】

试剂盒由 2×Plus SYBR real-time PCR　mixture，使用说明书和合格证组成。主要组分及储存条件见表 1 。

表 1　　试剂盒组成、储存、稳定性

产品名称	货号	包装	规格	保存
2×Plus SYBR real-time PCR mixture	PR7701	100 次	1ml	-20℃
	PR7702	500 次	5ml	-20℃
	PR7703	2500 次	25ml	-20℃
	PR7704	5000 次	50ml	-20℃

** 本试剂中另包装有 ROX Dye 或 ROXⅡ Dye*

【储存条件及有效期】

本试剂盒有效期一年，请在有效期内使用。

【适用仪器】

使用 ROX Ⅰ的主要机型

• ABI PRISM® 7000 and 7700 Sequence Detection System

• Applied Biosystems 7300 and 7900HT Real-Time PCR System

• Applied Biosystems GeneAmp® 5700 Thermal Cycler

• Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems

使用 ROXⅡ的主要机型

• Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time PCR System

• Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System

• Bio-Rad DNA Engine Opticon® and Opticon® 2 Real-Time PCR Detection Systems

• Bio-Rad/MJ Research Chromo4™ Real-Time Detector

• Cepheid SmartCycler® System

• Corbett Rotor-Gene™ 3000 and 6000 Real-Time Rotary Analyzer

• Eppendorf Mastercycler® ep realplex Real-Time PCR System

• Roche LightCycler® 480 Real-Time PCR System

• Stratagene Mx3000P® and Mx3005P® Real-Time PCR Systems

• Stratagene Mx4000® Multiplex Quantitative PCR System

【使用方法】

1．按照下表配制反应体系

组分	体积
DNA 模板	1 μl
上游引物(10 μM)	0.5 μl
下游引物(10 μM)	0.5 μl
2×Plus SYBR real-time PCR mixture	10 μl
DEPC-ddH_2O	补至 20 μl

2. 反应设置

两步法流程	温度	时间
预变性	94℃	2 min

变性	94℃	15 sec
退火-延伸	60℃	30 sec
		40-50 个循环
融解曲线		机器默认设置

三步法流程*	温度	时间
预变性	94℃	2 min
变性	94℃	15 sec
退火	60℃	15 sec
延伸	72℃	30 sec
		40-50 个循环
融解曲线		机器默认设置

*当两步法扩增效率不好的时候建议选择三步法进行 qPCR 反应。

本试剂盒提供的 ROX Dye 或 ROXII Dye 是 50×的，直接混到体系中使用，最终浓度是 1×。

【产品性能指标】

纯度检测：所有组分检测均无核酸外切酶、核酸内切酶、核酸残留。

功能检测：以质粒或者 HeLa 细胞总 RNA 逆转录产物的稀释液为模板，扩增 6 个基因，每个基因的融解曲线为单峰，特异性好，扩增曲线在批次间的产品中相近。

【注意事项】

1. 使用前，请查看有效期
2. 实验时，移液器应精准
3. 实验用到的耗材要提前灭菌
4. 按保存条件保存产品

疑难解答：

扩增曲线形状异常

1. 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统矫正后产生。提高模板浓度重复实验。
2. 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。
3. 个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡。处理样品时要注意离心，进行扩增反应之前

要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. 反应循环数不够：一般设置循环数为 40，但需要注意的是过多的循环会增加过多的背景信号，降低数据可信度。
2. 确认程序中是否设置了信号采集步骤：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℃延伸阶段。
3. 确认引物是否降解：长时间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。
4. 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
5. 模板降解：重新制备模板，重复实验。

C T 值出现太晚

1. 扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计合成引物。
2. 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
3. 模板降解：重新制备模板，重复实验。
4. PCR 产物太长：推荐 PCR 产物长度为 80 bp-150 bp。
5. 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者重新制备模板重复实验。

阴性对照出现明显扩增

1. 反应体系污染：更换新的 Mix、水、引物重复实验。反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染。
2. 引物二聚体的出现：配合融解曲线进行分析。

绝对定量时标准曲线线性关系不佳

1. 加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积。
2. 标准品降解：重新制备标准品，重复实验。
3. 模板浓度太高：提高模板稀释倍数。

融解曲线出现多峰

1. 引物设计不优：根据设计原则设计合成新的引物。
2. 引物浓度太高：适当降低引物浓度。
3. cDNA 模板带有基因组污染：重新制备 cDNA 模板

实验重复性差

1. 加样体积失准：使用性能较好的移液枪；将模板做高倍稀释，以大体积加入反应体系中。
2. 定量 PCR 仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。
3. 模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，减少模板稀释度或提高加样体积。

【生产企业】

企业名称：无锡百泰克生物技术有限公司

注册地址：无锡惠山经济开发区惠山大道 1719-5 号四层 A 区

生产地址：无锡惠山经济开发区惠山大道 1719-5 号四层 A 区

邮政编码：214100

电话/传真：400-6788982

网址：www.bioteke.cn

【说明书核准及修改日期】

说明书修改日期 2019 年 4 月 16 日