

HBStart Green qPCR Premix

Version: HBRG-ST-002



产品信息

产品名称	HBStart Green qPCR Premix
货号	HB-START-1000
存储及运输条件	-20°C避光保存，冰袋运输，Mix 融解后可在 4°C避光条件下稳定存放一个月，尽量避免反复冻融。
规格	1mL
有效期	2 年

产品简介

HBStart Green qPCR Premix 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，使产品具有特异性强、扩增效率高等特点，有效抑制非特异性扩增，可对较广浓度范围的模板进行准确定量，获得稳定可靠的 qPCR 结果。

预混液中含有独特校正染料，与一系列 qPCR 设备兼容，包括需要 ROX 校正的仪器，实验操作过程中不需要额外添加染料来校正仪器。

使用方法

1、使用注意

- ① 因 Mix 中预混有染料，其保存或反应体系配制过程应避免强光照射；
- ② 使用前上下颠倒轻轻混匀 Mix，请勿涡旋振荡混匀，避免产生过多气泡；
- ③ Mix 中含有 Universal 校正染料，适用于所有机型，无需额外添加染料。

2、建议的 qPCR 反应体系

试剂	使用量
HBStart Green qPCR Premix	5 μ l
正向引物(10 μ M)	0.4 μ l
反向引物(10 μ M)	0.4 μ l
DNA 模板	X μ l
Nuclease-Free Water	To 10 μ l

注：推荐模板加样量为 1~2 μ l，如模板类型为未稀释 cDNA 原液，模板添加量不应超过总反应体系的 10%。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。

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	30sec	
变性	95°C	10sec	} (40 Cycles)
退火&延伸	60°C	30sec	
熔解曲线	使用仪器默认采集程序		

三步法

步骤	温度	时间	
预变性	95°C	30sec	
变性	95°C	10sec	} (40 Cycles)
退火	55~65°C	10sec	
延伸	72°C	30sec	

注：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 200bp 以内，退火&延伸（延伸）时间可以设置为 15sec；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；不同 qPCR 仪的熔解曲线采集程序有差别，一般可使用仪器默认的熔解曲线采集程序。

4、实验优化

若使用默认反应条件反应性能不佳时，则需要对反应条件进行优化，可以从引物浓度以及扩增程序两个方面进行：

① 引物浓度调整

当引物终浓度在 0.1~1.0 μM 范围之内变化时，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 18~23 bp；
- ③ 正向引物和反向引物的 T_m 值相差不超过 1°C 为佳， T_m 值控制在 58~62°C 为佳；
- ④ 引物的 GC 含量控制在 40%~60% 之间；
- 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）
- ⑥ 引物 3'端最后一个碱基最好为 G 或者 C；
- ⑦ 避开引物内部或者两条引物之间的互补序列；
- ⑧ 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 Cq 值	减小基线终点(Cq 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 10min，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
	模板降解	重新制备模板，重复实验
Cq 值出现过晚	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 80~200bp

	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
空白对照出现信号	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
	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
熔解曲线出现多峰	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
	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
实验重复性差	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