



025-85653525

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室

AllStart[®] qPCR SYBR Green Master Mix

Q301



产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

目录 Product Manual

| | |
|----------------|---|
| 产品简介..... | 1 |
| 产品特点..... | 1 |
| 产品组成..... | 1 |
| 储存条件..... | 1 |
| 质量控制..... | 2 |
| 实验方案..... | 2 |
| 实验案例..... | 3 |
| 常见问题与解决方案..... | 4 |
| 引物设计注意事项..... | 5 |
| 注意事项..... | 5 |

产品简介

本产品可用于 SYBR[®] Green I 嵌合荧光法荧光定量 PCR，具有灵敏度高、特异性强、稳定性好的优点。核心组分 AllStart[®] Taq DNA Polymerase (ATG #P303) 是基于适配体修饰的热启动 DNA 聚合酶，配合针对 SYBR[®] Green I 嵌合荧光法而优化的最适 Buffer，可以抑制非特异性扩增，从而显著提高扩增效率，适用于进行高灵敏度 SYBR[®] Green I 嵌合荧光法 qPCR 检测反应。本产品是一种含有 SYBR[®] Green I 的 2 × 预混液，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量、检测，重复性好，可信度高，性能远超以化学修饰的 Taq 酶相关的 qPCR 试剂。

产品特点

反应速度极快

特异性好

灵敏度高

适配体修饰

平台期荧光强度高

产品组成

| 组分 | Q301 (500 rxns) (20 µl/rxn) | Q301 (2,500 rxns) (20 µl/rxn) |
|---|-----------------------------|-------------------------------|
| 2 × AllStart [®] qPCR SYBR Green Master Mix ^a | 5 ml | |
| 50 × ROX Reference Dye 1 ^b | 200 µl | Q301 (500 rxns) × 5 |
| 50 × ROX Reference Dye 2 ^b | 200 µl | |

a. 包含 dNTP Mix, Mg²⁺, AllStart[®] Taq DNA Polymerase 和 SYBR[®] Green I 等。

b. 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差, ROX Reference Dye 1 适用机型有: Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; Step One, Step One Plus。ROX Reference Dye 2 适用机型有: Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA7, QuantStudio 3, 5, 6Flex, 7Flex, 2K Flex; Stratagene MX4000, MX3005P, MX3000P。无需加 ROX 染料的机型有: Bio-Rad CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ5, MyiQ, MiniOpticon, Opticon, Optico 2, Chromo4; Cepheid SmartCycler; Eppendorf Mastercycler ep realplex, realplex 2s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Roche Applied Science LightCycler 480, 2.0, 96; Thermo Scientific PikoReal Cyler; Takara Thermal Cycle Dice Real Time System TP700, TP800, TP850, TP900, TP950; Monad q225, q225MX; 宏石 SLAN-96P, SLAN-96S, SLAN-48P; 天隆 TL988-II, TL988-IV, Gentier 96E; Analytikjena QTOWER2.0, QTOWER2.2; 杭州博日 LineGene 9600, LineGene K Plus; IT-IS MyGo Mini。

储存条件

-20°C保存, 于-20 ~ 0°C运输。▲避免反复冻融。

质量控制

纯度检测：

所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶、核酸残留。

功能检测：

以国家标准 SARS-CoV-2 RNA 的逆转录产物稀释液为模板，扩增 3 个基因，扩增曲线在批次间的产品中相近。

实验方案

1. 在 qPCR 管中配置如下混合液 (以 ABI StepOne Plus 为测试机型)：

| 组分 | 用量 |
|--|----------|
| 2 × AllStart [®] qPCR SYBR Green Master Mix | 10 μl |
| Primer 1 (10 μM) | 0.4 μl |
| Primer 2 (10 μM) | 0.4 μl |
| 50 × ROX Reference Dye 1 (可选) | 0.4 μl |
| Template DNA/cDNA | X μl |
| ddH ₂ O | to 20 μl |

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

- 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 μM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度 0.1 ~ 1.0 mM 范围内调整引物浓度。
- qPCR 灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。
- 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。

2. 按照以下条件进行 qPCR 反应

| 步骤 | 温度 | 时间 | 阶段 | 循环数 |
|--------------------|------|----------------|---------|----------|
| 预变性* ¹ | 95°C | 30 sec ~ 3 min | Stage 1 | Reps: 1 |
| 循环反应* ² | 95°C | 3 ~ 10 sec | Stage 2 | Reps: 40 |
| | 60°C | 10 ~ 30 sec | | |

*1. AllStart[®] Taq DNA Polymerase 需要热激活处理以恢复酶活，请设置 PCR 反应预变性条件为 95°C 30 sec。如果模板的 GC 含量较高，可将预变性时间延长至 3 min。

*2. 延伸时间请根据您使用的 Real-time PCR 仪所需的数据采集最短时间自行调整：使用 ABI 7700 和 7900H 时至少 30 sec；使用 ABI 7000 和 7300 时至少 31 sec；使用 ABI 7500 时至少 34 sec；使用 ABI StepOnePlus 时至少 10 sec。

实验案例

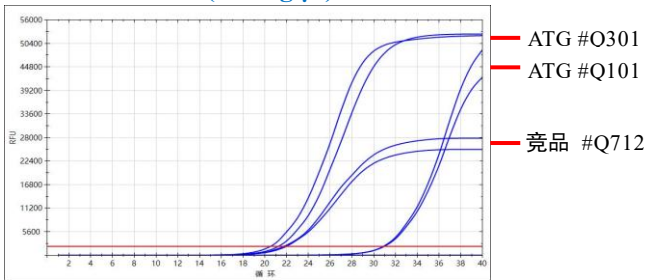
作为以 AllStart® Taq DNA Polymerase (ATG #P303) 为核心开发的 AllStart® qPCR SYBR Green Master Mix (ATG #Q301), 在检测 RNA 类病毒和 DNA 类病毒质粒时均表现出媲美甚至超越抗体法修饰的竞品性能, 灵敏度优于竞品 0.5 ~ 1 个循环, 平台期荧光强度是抗体法修饰的两倍。甚至变性时间缩减到了 3 sec, 仍能维持优秀性能。

ATG #Q101: 化学法修饰

ATG #Q301: 适配体修饰

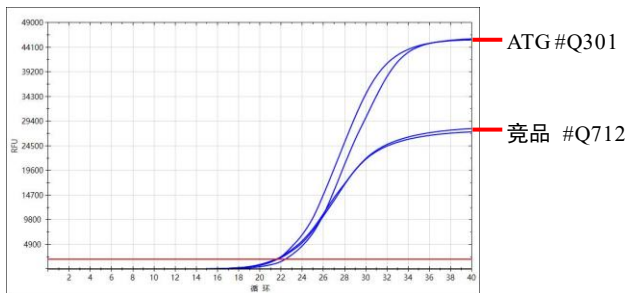
竞品 #Q712: 抗体法修饰

以新冠 N 基因 (10^{-4} ng/ μ l) 做为竞品对比的检测模板



| 步骤 | 温度 | 时间 | 阶段 | 循环数 |
|------|------|------|---------|----------|
| 预变性 | 95°C | 30 s | Stage 1 | Reps: 1 |
| 循环反应 | 95°C | 10 s | Stage 2 | Reps: 40 |
| | 60°C | 30 s | | |

Fig. 1 循环反应变性 10 sec 与竞品性能对比-N 基因



| 步骤 | 温度 | 时间 | 阶段 | 循环数 |
|------|------|------|---------|----------|
| 预变性 | 95°C | 30 s | Stage 1 | Reps: 1 |
| 循环反应 | 95°C | 3 s | Stage 2 | Reps: 40 |
| | 60°C | 10 s | | |

Fig. 2 循环反应变性 3 sec 与竞品性能对比-N 基因

以猴痘 F3L 基因 (10⁻⁴ ng/μl) 做为竞品对比的检测模板

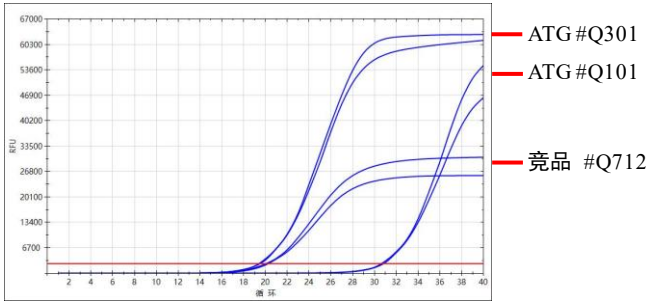


Fig. 3 循环反应变性 10 sec 与竞品性能对比-F3L 基因

| 步骤 | 温度 | 时间 | 阶段 | 循环数 |
|------|------|------|---------|----------|
| 预变性 | 95°C | 30 s | Stage 1 | Reps: 1 |
| 循环反应 | 95°C | 10 s | Stage 2 | Reps: 40 |
| | 60°C | 30 s | | |

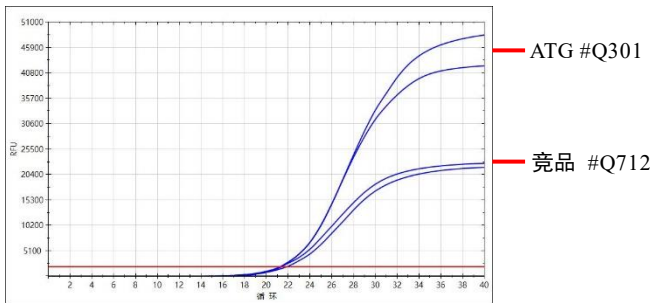


Fig. 4 循环反应变性 3 sec 与竞品性能对比-F3L 基因

| 步骤 | 温度 | 时间 | 阶段 | 循环数 |
|------|------|------|---------|----------|
| 预变性 | 95°C | 30 s | Stage 1 | Reps: 1 |
| 循环反应 | 95°C | 3 s | Stage 2 | Reps: 40 |
| | 60°C | 10 s | | |

常见问题与解决方案

扩增曲线形状异常

扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统校正后产生。提高模板浓度重复性实验；ROX 类型使用错误，确认所用 ROX 与机型是否匹配。

扩增曲线断裂或者下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于 CT。减小基线终点 (CT 值-4)，重新分析数据。

个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡。处理样本时要注意离心，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

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多背景信号，降低数据可信度。

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°C 延伸阶段。

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。

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。

模板降解：重新制备模板，重复实验。

CT 值出现太晚

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。

模板浓度太低：减少稀释度重读实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。

模板降解：重新制备模板，重复实验。

PCR 产物太长：推荐 PCR 产物长度为 80 ~ 150 bp。

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

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置，减少气溶胶污染。

绝对定量时标准曲线线性关系不佳

加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积。

标准品降解：重新制备标准品，重复实验。

模板浓度太高：提高模板稀释倍数。

实验重复性差

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。

定量 PCR 仪不同的位置温度控制不一致：定期校准仪器。

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。

引物设计注意事项

引物 3'端最后一个碱基选择 C 或 G；

引物 3'端最后 8 个碱基应避免出现连续错配；

引物 3'端尽量避免出现发夹结构；

引物 T_m 值控制在 55°C ~ 65°C 之间；

引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物 T_m 值计算；

引物 GC 含量控制在 40% ~ 60% 之间；

正向引物和反向引物 T_m 值以及 GC 含量尽可能一致。

注意事项

1. 本品尽量避免反复冻融，以免酶活下降。如每次使用量较少，推荐小份分装使用。
2. 使用前请上下颠倒以混匀 Mix，请勿 vortex 以免产生过多气泡引起反应体系体积失准，进而影响定量结果。Mix 经混匀轻微离心后即可使用。使用过程中吹打要轻，如果操作不慎 Mix 起泡，需再次离心方可使用。
3. 由于本品中含有荧光染料 SYBR[®] Green I，因此无论保存 Mix 还是配制反应体系时都应该尽量避免强光照射，建议用锡箔纸包好。
4. 由于本品检测灵敏度极高，即使空气中微量的 DNA 气溶胶都可以引起污染，进而导致实验失败。因此反应体系配制时请于超净工作台内进行，配制过程中请使用干净灭菌枪头、反应管，条件容许的实验室推荐使用专用的移液枪，避免污染。推荐使用带滤芯的枪头。