

**AllStart<sup>®</sup> qPCR SYBR Color**

**Master Mix (High ROX)**

**模板示踪型染料法荧光定量预混液**

**(适配体热启动) (High ROX)**

**Q311-H**

Version 23.1.1



**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
产品应用 .....	1
储存条件 .....	1
实验方案 .....	2
常见问题与解决方案 .....	3
注意事项 .....	4

## 产品简介

本产品基于 SYBR Green I 嵌合荧光染料法 qPCR 反应预混液产品开发, 内置的黄色样本稀释液与蓝色反应缓冲液混合后, 会产生变色效应追踪移液过程, 从而减少移液错误。核心组分 AllStart® Taq DNA Polymerase 为一种新型的适配体修饰热启动 Taq DNA 聚合酶, 具有特异性强、灵敏度高、全程无缝热启动等优势, 结合精细优化的 qPCR 反应缓冲液及关键调节因子, 可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线, 对靶基因定量准确、重复性好、可信度高。

## 产品特点

### ❖ 可视化移液

蓝黄染料混样变色效应, 可视化示踪移液过程, 减少操作失误

### ❖ 卓越级性能

基于适配体修饰的 Taq DNA 聚合酶, 全程无缝热启动, 灵敏特异, 定量准确

## 产品组成

组分	Q311-H (500 rxns) (20 µl/rxn)
2 × AllStart® qPCR SYBR Color Master Mix (High ROX) <sup>a</sup>	5 × 1 ml
10 × Yellow Dilution Buffer	1.25 ml

a. Q311-H (High ROX 版) 适用的机型: Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; Step One, Step One Plus。

## 产品应用

动植物等生物样本基因表达量分析

## 储存条件

-30 ~ -15°C 避光保存, ≤0°C 运输。

## 实验方案

1. 用 10 × Yellow Dilution Buffer 和 ddH<sub>2</sub>O 稀释 DNA/cDNA 原液, 制备得到用于 qPCR 反应的模板, 此时 Yellow Dilution Buffer 在模板中终浓度为 1 ×。

组分	用量	终浓度
DNA 干粉或 DNA/cDNA 溶液	X *	Y *
10 × Yellow Dilution Buffer	1 μl	1 ×
ddH <sub>2</sub> O	to 10 μl	

\*DNA 添加量及终浓度根据常规 qPCR 规范和个人实验需求调整。

2. 在 qPCR 专用离心管进行反应体系配制:

组分	用量
2 × AllStart <sup>®</sup> qPCR SYBR Color Master Mix (High ROX)	10 μl
Primer 1 (10 μM) <sup>a</sup>	0.4 μl
Primer 2 (10 μM) <sup>a</sup>	0.4 μl
Template DNA/cDNA <sup>b</sup>	1 - 8 μl <sup>b</sup>
ddH <sub>2</sub> O	to 20 μl

a. 一般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 μM 范围内调整引物浓度。

b. Template DNA/cDNA 来自上一步用 10 × Yellow Dilution Buffer 和 ddH<sub>2</sub>O 稀释配制而得, 推荐范围内模板使用体积越大, 颜色变化越明显, 加 1 μl 颜色变化较浅, 但颜色也有变化; 当模板类型为未稀释 cDNA 原液时, 不论其是否包含 1 × Yellow 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. 程序设置:

步骤	温度	时间	阶段	循环数
预变性 <sup>a</sup>	95°C	30 sec	Stage 1	Rep: 1
循环反应 <sup>b</sup>	95°C	10 sec	Stage 2	Reps: 40
	60°C <sup>c</sup>	30 sec		
熔解曲线	使用仪器默认熔解曲线采集程序			

a. 该预变性条件适合绝大多数扩增反应, 如模板结构复杂, 可将预变性时间延长至 3 min 以提高预变性效果;

b. 对于 300 bp 以内的扩增子而言, 延伸时间设置为 30 sec 即可; 超过 300 bp 的扩增子, 推荐延长延伸时间至 60 sec;

c. 荧光信号采集

## 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℃ 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。

## 注意事项

- ❖ 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。
- ❖ 使用前请上下颠倒以混匀 Mix，请勿涡旋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。
- ❖ 由于本品中含有荧光染料 SYBR<sup>®</sup> 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。
- ❖ 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。

## 引物设计

- ❖ 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<sub>m</sub> 值控制在 55℃ ~ 65℃ 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<sub>m</sub> 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<sub>m</sub> 值以及 GC 含量尽可能一致。



025-85653525

[www.atgbiotechnology.com](http://www.atgbiotechnology.com)

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室