

Hieff UNICON[®] Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix

产品信息

| 产品名称 | 产品编号 | 规格 |
|---|-----------|----------|
| Hieff UNICON [®] Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix | 11184ES03 | 1 mL |
| | 11184ES08 | 5×1 mL |
| | 11184ES25 | 5×5 mL |
| | 11184ES50 | 50×1 mL |
| | 11184ES60 | 100×1 mL |

产品描述

Hieff UNICON[®] Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix 是 2×实时定量 PCR 扩增的预溶液，具有高灵敏度和高特异性的特点，颜色为蓝色，具有加样示踪的作用。核心组分 Hieff UNICON[®] Taq DNA 聚合酶采用抗体法热启动，可以有效抑制样品准备过程中引物退火导致的非特异性扩增。同时配方添加了提升 PCR 反应扩增效率因子和均衡不同 GC 含量（30~70%）基因扩增的促进因子，使定量 PCR 可以在宽广的定量区域内获得良好的线性关系。

本产品中含有特殊的 ROX Passive Reference Dye，适用于所有 qPCR 仪器，无需在不同的仪器上调整 ROX 的浓度，只需在配制反应体系时加入引物和模板即可进行扩增。

运输和保存方式

冰袋运输。-20℃避光储存，有效期 18 个月。

本品避免反复冻融。产品中含有荧光染料 SYBR Green I，保存或配制反应体系时需避免强光照射。

注意事项

1. 推荐使用本公司 cDNA 合成试剂盒（货号：11141ES），以有效去除 RNA 样品中残留的基因组。
2. 解冻后 Master Mix 可能出现絮状或白色沉淀，手握缓慢溶解并上下轻柔颠倒混匀至溶液澄清，不影响试剂性能。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
4. 本产品仅作科研用途！

反应体系

| 组分 | 体积 (μL) | 体积 (μL) | 终浓度 |
|---|---------|---------|--------|
| Hieff UNICON [®] Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix | 25 | 10 | 1× |
| Forward Primer (10 μM) | 1 | 0.4 | 0.2 μM |
| Reverse Primer (10 μM) | 1 | 0.4 | 0.2 μM |
| 模板 DNA | X | X | - |
| 无菌超纯水 | to 50 | to 20 | - |

【注】：使用前务必充分混匀，避免剧烈震荡产生过多气泡。

- a) **引物浓度：**通常引物终浓度为 0.2 μM，也可以根据情况在 0.1-1.0 μM 之间进行调整。
- b) **模板浓度：**如模板为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。
- c) **模板稀释：**cDNA 原液建议 5-10 倍稀释，最佳模板加入量以扩增得到的 Ct 值在 20-30 个循环为好。
- d) **反应体系：**推荐使用 20 μL 或 50 μL，以保证目的基因扩增的有效性和重复性。
- e) **体系配制：**请于超净工作台内配制，并使用无核酸酶残留的枪头、反应管；推荐使用带滤芯的枪头。避免交叉污染和

气溶胶污染。

标准程序

| 循环步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|--------|--------|---------|------|
| 预变性 | 95°C | 2 min | 1 |
| 变性 | 95°C | 10 sec | } 40 |
| 退火/延伸 | 60°C | 30 sec* | |
| 熔解曲线阶段 | 仪器默认设置 | | 1 |

快速程序

| 循环步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|--------|--------|---------|------|
| 预变性 | 95°C | 30 sec | 1 |
| 变性 | 95°C | 3 sec | } 40 |
| 退火/延伸 | 60°C | 20 sec* | |
| 熔解曲线阶段 | 仪器默认设置 | | 1 |

【注】 快速程序适用于绝大多数基因，个别复杂二级结构基因可尝试标准程序。

a) **退火温度和时间**：请根据引物和目的基因的长度进行调整。

b) **荧光信号采集 (★)**：请勿忘记打开荧光信号采集，按照仪器使用说明书要求进行实验程序设置，几种常见仪器的时间设定如下：

20 sec: Applied Biosystems 7700, 7900HT, 7500 Fast

31 sec: Applied Biosystems 7300

32 sec: Applied Biosystems 7500

c) **熔解曲线**：通常情况下可以使用仪器默认程序。

结果分析

定量实验至少需要三个生物学重复。反应结束后需要确认扩增曲线及熔解曲线。

1) **扩增曲线**：标准扩增曲线为 S 型。

Ct 值落在 20-30 之间时，定量分析最准确；

Ct 值小于 10，需要将稀释模板后，重新进行实验；

Ct 值介于 30-35 之间时，需要提高模板浓度，或者增大反应体系的体积，以提高扩增效率，保证结果分析的准确性；

Ct 值大于 35 时，检测结果无法定量分析基因的表达式，但可用于定性分析。

2) **熔解曲线**：

熔解曲线单峰，表明反应特异性好可以进行定量结果分析；若熔解曲线出现双峰或者多峰，则不能进行定量分析。

熔解曲线出现双峰，需要通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳判断非目标峰是引物二聚体还是非特异性扩增。

如果是引物二聚体，建议降低引物浓度，或者重新设计扩增效率高的引物。

如果是非特异性扩增，请提高退火温度，或者重新设计更高特异性的引物。

引物设计指南

1. 推荐引物长度 25 bp 左右。扩增产物长度 150 bp 为佳，可以在 100 bp-300 bp 内选择。
2. 正向引物和反向引物的 Tm 值相差不宜超过 2°C。引物 Tm 值 60°C-65°C 为佳。
3. 引物碱基分布要均匀，避免出现连续的 4 个相同碱基，GC 含量控制在 50% 左右。3' 端最后一个碱基最好为 G 或 C。
4. 引物内部或者正反两条引物间最好避免出现有 3 个碱基以上的互补序列。
5. 引物特异性需要用 NCBI BLAST 程序进行核对。避免引物 3' 端有 2 个碱基以上的非特异性互补。
6. 设计完成的引物需要进行扩增效率的检测，只有具备相同扩增效率的引物才可用于定量比较分析。

适用机型

ABI: 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT Fast, StepOne, StepOne Plus; 7500, 7500 Fast, ViiA7, QuantStudio 3 and 5, QuantStudio 6,7,12k Flex;

Stratagene: MX3000P, MX3005P, MX4000P;

Bio-Rad: CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ5, MyiQ, MiniOpticon, Opticon, Opticon 2, Chromo4;

Eppendorf: Mastercycler ep realplex, realplex 2 s;

Qiagen: Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000;

Roche Applied Science: LightCycler 480, LightCycler 2.0; Lightcycler 96;

Thermo Scientific: PikoReal Cycler;

Cepheid: SmartCycler; **Illumina:** Eco qPCR.