产品组分

组分名称	组分编号	规格-1 1 mL	规格-2 5 mL	规格-3 25 mL
BrightCycle Blue Universal SYBR Green qPCR Mix with UDG II *	RM21228	1 mL	5 × 1 mL	25 × 1 mL
10X Template Dilution Buffer**	RM21229	200 μL	1 mL	5 × 1 mL

*** 注 1：包含 ABclonal Hot-Start Taq DNA 聚合酶、Mg^{2+}、dNTPs、SYBR® Green I、Universal ROX Dye 等。**

**** 注 2：10X 黄色浓缩模板稀释液。**

产品说明

本产品为蓝色的通用型 SYBR Green 试剂，便于加样，且使用特殊设计的参比染料（ROX），具有更灵敏的分辨率，能够适用于市面上所有型号的荧光定量 PCR 仪器（包括 High ROX、Low ROX 以及 No ROX 需求的仪器）。本试剂引入了 dUTP/UDG 防污体系，UDG 在室温下就可将含 U 的污染物迅速降解，95℃预变性时 UDG 迅速失活，不会影响 qPCR 的效率和灵敏度。本产品采用热启动 Taq DNA 聚合酶进行扩增，在保证扩增效果的同时极大地提高了产品的特异性。此外，本产品可利用不同颜色染料混合后产生的变色效应追踪移液过程，从而显著减少移液错误。

保存条件

-20℃，避光保存

适用机型

本产品为通用型 qPCR 试剂，适用于市面上所有型号的荧光定量 PCR 仪器（包括 High ROX、Low ROX 以及 No ROX 需求的仪器）。

实验准备

1. 相应 EP 管、PCR 管、移液器和枪头、冰盒或冰。
2. qPCR 引物和相应模板。
3. qPCR 专用平板及密封光学薄膜。

注意事项

1. BrightCycle Blue Universal SYBR Green qPCR Mix with UDG II 在使用前请充分融解，避免强光直射，并注意避光保存。
2. BrightCycle Blue Universal SYBR Green qPCR Mix with UDG II 中含有甘油，在使用前请轻轻混匀，避免产生气泡；取用之前应混匀并离心。使用后立即放回-20℃ 冰箱保存。
3. 本品含有 DNA 聚合酶，使用时请置于冰上，短时间内多次使用可在 4℃ 暂存，应尽量避免反复冻融。
4. BrightCycle Blue Universal SYBR Green qPCR Mix with UDG II 外观为蓝色试剂，10X Template Dilution Buffer 外观为黄色试剂，当蓝色试剂中加入用 Template Dilution Buffer 稀释的扩增模板(黄色)后会产生蓝色→绿色的变色效应，从而可以根据液体颜色准确判断是否已加入模板。
5. 若使用 Template Dilution Buffer 进行移液追踪（qPCR 模板中已包含 1X Template Dilution Buffer），模板使用体积请勿超出 2-5 μL/20 μL reaction 范围。如果模板使用量低于 2 μL/20 μL reaction，会造成显色偏淡，影响追踪效果；如果模板使用量高于 5 μL/20 μL reaction，Template Dilution Buffer 中的有效成分有可能会干扰 qPCR 反应。
6. Template Dilution Buffer 如果使用方式不当，有可能对 qPCR 结果产生一定的影响。
7. Template Dilution Buffer 使用方法参考如下表，如不需要进行模板示踪，则不使用 Template Dilution Buffer 即可。

模板状态	举例	10X Template Dilution Buffer 使用方法	模板中 Dilution Buffer 浓度
斑块/粉末	未溶解的 DNA 固体	使用 ddH_2O 将 10X Dilution Buffer 稀释至 1X，将合适体积的 1X Dilution Buffer 用作溶液溶解 DNA 固体。	1X
溶液	cDNA 或基因组 DNA 溶液	使用 ddH_2O 将模板稀释到目标浓度，然后在每 9 μL 模板中加入 1 μL 10X Dilution Buffer。	1X

操作方法

实验前准备

1. 扩增产物的长度建议选择在 70-200 bp 范围内。
2. 建议 20 μL 反应体系中加入 1 pg-50 ng 的 DNA 为模板，并设置 NTC（无模板对照）。
3. 为确保实验结果的准确性，建议每个样品和对照组重复 3 次。

实验方法

1. 配制 qPCR 反应体系

组分	加入量
BrightCycle Blue Universal SYBR Green qPCR Mix with UDG II	10 μL
DNA 模板 *	2 μL
正向引物（10 μM）**	0.4 μL
反向引物（10 μM)）**	0.4 μL
dd H_2O	To 20 μL

***注：以 10 pg-10 ng 的基因组 DNA，或 10 pg-100 ng cDNA 为模板参照量，因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。另外，两步法 RT-qPCR 反应的 cDNA（RT 反应液）作为模板时，添加量不要超过 qPCR 反应体系的 10%。**

****注：通常引物终浓度为 0.2 μM 时可以得到较好的结果，可以终浓度 0.1-1.0 μM 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，并优化反应体系。**

2. 设置 qPCR 反应程序：

步骤	温度	时间	循环数
UDG 反应	37 ℃	2 min	1
预变性	95 ℃	3 min	1
循环反应	95 ℃	5 s	40
	60 ℃	30-34 s *	
熔解曲线	仪器默认设置		

***注：确保延伸后进行信号采集。延伸时间根据 qPCR 仪所需数据采集时间自行调整：使用 StepOnePlus 请设定为 30 s；使用 7300 请设定为 31 s；使用 7500 请设定为 34 s。若无特殊说明，设定为 30 s 即可。**

数据分析

1. 根据 Ct 值和样品投入量绘制标准曲线。标准曲线相关系数（R^2）> 0.98，标准曲线斜率介于-3 至-3.5 之间，PCR 扩增效率（E）一般介于 90-120%之间。
2. 重复管之间 Ct 值的标准差 < 0.2，不同批次间同一实验的 Ct 值的标准差 < 0.5（不同批次同一实验对比需保证阈值设置基本一致）。
3. 扩增产物的熔解曲线无明显非特异性扩增产物（杂峰）或引物二聚体杂峰（必要时请进行琼脂糖电泳确认），并且熔解曲线的 Tm 值一般在 80-95℃之间。
4. 有效 Ct 的确认：有效的扩增的 Ct 值应小于无模板对照曲线的 Ct 值，并且其熔解曲线无杂峰。