



KT AntiQ qPCR SYBR Green Fast Mix(Universal)

目录号

MG-QP-01

产品组成

组分	规格
2×KT AntiQ qPCR SYBR Fast Mix(Universal)	5×1.0mL

保存条件

-20℃避光保存 12 个月。

产品简介

本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 反应的专用试剂。产品中包含抗体修饰的新型热启动 KT AntiQ DNA polymerase 和精心优化的 Buffer，能有效抑制低温下的非特异性扩增，大大提高了反应特异性和扩增效率，能够在更宽广的范围内进行准确定量。此外，本产品含有独特的校正染料，与一系列 qPCR 仪器兼容，包括需要 ROX 校正的仪器，实验过程中无需额外添加染料来校正仪器。

产品特点

- 高特异性：采用抗体修饰的新型热启动 KT AntiQ DNA polymerase 和精心优化的 Buffer；
- 操作简便：2×预混液中包含有 qPCR 反应所需所有组分，只需加入模板、引物和水即可进行反应。

适用范围

本产品适用于试剂盒提取的基因组 DNA、cDNA、质粒 DNA 和λDNA 等样本的扩增定量。

注意事项

1. 使用前请充分溶解混匀，尽量避免反复冻融，以免酶活下降；
2. 本产品中含有 SYBR Green I，需避光保存，使用时尽量避免强光照射；
3. 为了避免气溶胶污染，建议使用核酸清洁剂对实验台面及操作环境进行清洁；
4. 为不影响后续实验，建议做预实验检查引物有效性和特异性；
5. 上机前，注意消除体系中的气泡，以免对结果造成影响。

本产品仅供科研使用



使用方法

操作示例

按下表配制 qPCR 反应体系（冰上配制）

组分	20 μ L 体系	终浓度
2 \times KT AntiQ qPCR SYBR Fast Mix(Universal)	10 μ L	1 \times
Primer 1 (10 μ M) ^a	0.4 μ L	0.2 μ M
Primer 2 (10 μ M) ^a	0.4 μ L	0.2 μ M
Template DNA ^b	As require	-
ddH ₂ O	Up to 20 μ L	-

- 引物终浓度推荐 0.4 μ M，当反应性能较差时，可在终浓度 0.2~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。推荐引物长度 25 bp 左右、T_m 值 60°C~65°C 为佳，GC 含量控制在 50% 左右、3' 端最后一个碱基最好为 G 或 C，比对引物避免 3' 端或引物间有非特异性互补；
- 为保证扩增效率，建议将模板适当稀释后再进行 qPCR 反应。若模板为 cDNA 原液，则使用体积不超过 qPCR 反应总体积的 1/10，即 2 μ L/20 μ L 体系。

推荐的 qPCR 程序

● 两步法扩增程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 s	1
变性	95°C	10 s	40 cycles
退火/延伸 ^a	60°C	30 s	

● 三步法扩增程序（当模板浓度低或 qPCR 扩增效率低时可尝试）

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 s	1
变性	95°C	10 s	40 cycles
退火 ^a	55~65°C	10 s	
延伸 ^a	72°C	30 s	

注：熔解曲线使用仪器默认程序即可。

- 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 200 bp 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 仪所需的最短数据采集时间自行调整。



结果分析

- 1. NTC (No Template Control, 无模板阴性对照) :** 若 NTC 的 CT 值大于 35 或无 CT, 则体系不存在污染; 若 CT 值小于 35, 则体系可能存在污染或引物不特异, 形成引物二聚体, 建议清洁实验环境、更换无菌水、检查引物是否污染, 或适当降低引物浓度、优化引物设计。
- 2. 扩增曲线及 CT 值:** 标准扩增曲线呈光滑的“S”型。一般情况下目的基因 Ct 值在 20~30 之间, 内参 Ct 值在 15~20 之间。若 Ct 值较小, 建议稀释模板; 若 Ct 值较大, 建议提高模板浓度或增大反应体系; 若 Ct 值大于 35, 检测结果无法定量分析基因的表达量, 但可用于定性分析。
- 3. 熔解曲线:** 标准熔解曲线呈单峰。若熔解曲线出现双峰或者多峰, 可能存在污染、引物二聚体或非特异扩增, 建议降低引物浓度或优化引物设计。

常见问题与解决办法

Q1: 无 Ct 值出现?

A1:

- (1) 采集荧光信号的步骤有误。检查程序设置, 两步法扩增在退火延伸步骤采集信号, 三步法扩增在延伸阶段采集信号;
- (2) 引物或模板降解。PAGE 电泳检测引物完整性, 琼脂糖凝胶电泳检测模板 DNA 或 RNA 的质量及完整性, RNA 模板建议重新逆转录获得 cDNA, cDNA 应尽快使用;
- (3) 模板量不足。适当增加模板用量或重新制备高浓度模板。

Q2: 实验重复性差?

A2:

- (1) 加样存在误差。使用性能较好的移液枪, 配制预混液后分装, 减少移液误差;
- (2) 荧光定量 PCR 仪器不同位置温度控制不一致。定期校准仪器;
- (3) 模板浓度低或拷贝数低。适当增加模板用量。

Q3: 扩增曲线形状异常?

A3:

- (1) 扩增曲线不光滑。信号太弱, 经系统矫正后产生, 可提高模板浓度重复实验;
- (2) 扩增曲线断裂、骤降。模板浓度较高或反应管内留有气泡, 减小基线终点(CT 值-4)重新分析数据, 或上机前离心并仔细检查反应管内是否有气泡残留。