

# Toro 2X qPCR Master Mix Bench work

## 反应体系配制

-使用前 2×qPCR 预混液必须在室温避光下完全融化，且涡旋混匀后离心后使用。注:由于添加了大量稳定剂，预混液中可能有结晶沉淀产生，完全融化后可以正常使用；请在室温下进行体系配制，以防稳定剂微量结晶造成混合不均。

-为了降低加样误差，需做根据模板和基因数量进行布板设计及加样设计。按照如下两种情况，总反应体系分成两部分在室温下进行总管配制及分装\

### 同板内基因多样本少时的加样设计

组分	20μL 反应体积×n	操作方式
qPCR Master Mix	10μL×n	混合及分装
模板 DNA 稀释液	2μL×n	
2μM 上游引物	4μL×n	混合及分装
2μM 上游引物	4μL×n	

### 同板内样本多基因少时的加样设计

组分	20μL 反应体积×n	操作方式	
qPCR Master Mix	10μL×n	混合	混合及分装
8μM Reverse primer	1μL×n		
8μM Reverse primer	1μL×n		
模板 DNA 稀释液	8μL×n	混合及分装	

注: -引物在反应体系终浓度推荐为 0.4μM，请在 0.4-1.0μM 之间进行优化调整。

-布板及总管加样设计是通过加大移液体积来提高复孔重复性，对低丰度基因表达分析非常重要。

-请将逆转录产物至少稀释 5 倍以上使用，以防逆转录缓冲液成分抑制 qPCR 反应。

-轻轻混合后瞬时离心后上机。

## qPCR Machine operation

PCR 反应条件设置 - 绝大多数情况使用两步法：两步法循环条件

预变性	95°C	3min	1 循环
变性	95°C	10sec	40 循环
退火/ 延伸	60°C	30sec	

荧光信号采集应该在延伸步骤进行，收集时间不低于 10sec。

当 T<sub>m</sub> 值太低或两步法扩增不正常时采用三步法：三步法循环条件

1 预变性	95°C	5min	1 循环
2   变性	95°C	15sec	40 循环
2   退火	T <sub>m</sub> -5°C	30sec	
2   延伸	72°C	60sec	
3 终延伸	72°C	5min	1 循环

荧光信号采集应该在延伸步骤进行，收集时间不低于 10sec。

注：当扩增片段≥200bp 时，如 DNA 文库定量时请使用三步法扩增。

### 【引物设计】

- 引物长度: 18~30bp -引物 GC 含量: 40~80% -扩增子长度:≤200 bp
- 引物浓度：引物在反应体系终浓度推荐为 0.4μM，请在 0.4-1.0μM 之间进行优化调整。
- 引物验证:-无模板对照（NTC）实验可区分 SYBR Green I qPCR 反应中引物二聚体的非特异扩增和特异 PCR 产物。需用 NTC 实验验证每对引物，以评估引物二聚体影响程度。NTC 实验 C<sub>q</sub><40 时，应重新设计引物。
- 将 DNA 模板稀释 5 个或更多梯度，使用新设计引物及 DNA 稀释液进行 qPCR 分析，并绘制标准曲线。确保 PCR 效率在 95%至 105%之间，R<sup>2</sup>≥0.99。如果 PCR 效率或 R<sup>2</sup> 超出这些范围，应优化引物浓度和反应条件。若不能改善结果，应当重新设计引物。

### 【模板 DNA】

- 基因组 DNA：纯化的 DNA 可直接进行实时定量 PCR，推荐使用浓度为 1~10ng，C<sub>q</sub> 值处于 15-35 之间。
- cDNA：纯化的总 RNA 或 poly（A）+RNA 的逆转录反应液需稀释后用于实时定量 PCR，稀释是为了避免逆转录缓冲液对 qPCR 体系的抑制干扰，稀释倍数建议至少 5 倍。在进行逆转录反应之前，必须使用逆转录阴性对照来评估基因组 DNA 污染的影响程度。如果基因组 DNA 污染影响 C<sub>q</sub> 值，则必须通过 DNA 酶处理来消除这种影响。