**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 | | 混合及分装 |
| 8μM Reverse primer | 1μL×n | 混合 |
| 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℃ | 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Tm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℃ | 5min | 1循环 |
| 2｜变性 | 95°C | 15sec | 40循环 |
| 2｜退火 | Tm-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Cq<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，R2≥0.99。如果PCR效率或R2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，Cq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Cq值，则必须通过DNA酶

处理来消除这种影响。