



实时荧光定量 PCR 试剂盒

2× SYBR Green qPCR Master Mix

货号：C6028

规格：50T/200T

保存条件：-20°C长期保存，有效期 24 个月。经常使用，可置于 4°C 保存至少 6 个月。

产品简介：

本产品采用 Sybrgreen 嵌合荧光法进行荧光定量的专用试剂。制品中含有荧光定量反应的最适浓度 Sybrgreen，是一种 2×浓度的预混试剂，进行实验时，PCR 反应液的配制十分方便简单。制品中使用了 antiTaq 抗体的 Hot Start 法用 DNA 聚合酶，与荧光定量反应适合 Buffer 组合，可以有效抑制非特异性的 PCR 扩增，大大提高 PCR 的扩增效率，可以进行高灵敏度的荧光定量扩增反应。

另外，本产品中添加了 Tli RNaseH (耐热性 RNaseH)，以 cDNA 作为模板进行 PCR 反应时，可以很好地抑制由于 cDNA 中残存 mRNA 对 PCR 反应造成的阻碍作用。适合于快速荧光定量扩增反应，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量、检测，重复性好，可信度高。

产品组分：

组分名称	50T	200T
2x M5 HiPer SYBR Premix EsTaq (withTli RNaseH) *	1.25 ml	5×1 ml
ROX Reference Dye (50×) **	50 μl	200 μl
ROX Reference Dye II (50×) **	50 μl	200 μl

*由以下组分预混而成：EsTaq，dNTP Mixture，Mg²⁺，Tli RNaseH，Sybrgreen。

** ROX Reference Dye 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。例如使用 Applied Biosystems 的 Real Time PCR 扩增仪进行实验就需要校正。

◆ 需要使用 ROX Reference Dye 校正的仪器 Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆ 需要使用 ROX Reference Dye II 校正的仪器 Applied Biosystems 7500 和 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)

◆ 不需要校正的仪器 Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990) Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (Code No. TP700/TP760) Smart Cycler II System(Cepheid) LightCycler/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics) CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

使用注意：

1. 使用前，请上下轻轻颠倒混匀，避免产生气泡，防止因混合不均匀造成的反应效果不佳。但请勿涡旋振荡混匀。

2. Sybrgreen Premix EsTaq 在 -20°C 存放可能会产生白色或淡黄色的沉淀，可用手握缓慢溶解，于室温短时间避光放置，轻柔上下颠倒混匀直至沉淀全部消失。沉淀会导致溶液成分不均匀，使用前务必充分混匀

试剂。

3. 配制反应液时，试剂请于冰上放置。反应液的配制、分装请一定使用新的（无污染的）枪头、Microtube 等，尽量避免污染。

4. 本制品中含有荧光染料 Sybrgreen，配制 PCR 反应液时应避免强光照射。

所需试剂：

本产品为 2×预混荧光定量 PCR 反应体系，使用时只需加入模板、引物和水，使其工作浓度为 1×,即可进行反应。具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点，可最大限度地减少人为误差、节约 PCR 实验操作时间、降低污染几率。

操作示例：

本操作以 Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR System 的操作方法为例，其他仪器请严格按照不同操作手册进行实验。

1、按下表配制 PCR 反应体系：

组分名称	50μl 体系	20μl 体系
Template DNA***	4 μl	2 μl
2x M5 HiPer SYBR Premix EsTaq (withTli RNaseH)	25μl	10 μl
Primer 1 (10μM)*	1 μl	0.4 μl
Primer 2 (10μM)*	1 μl	0.4 μl
ROX Reference Dye (50x) or ROX Reference Dye II (50x)**	1 μl	0.4 μl
ddH2O	18 μl	6.8 μl
	50 μl	20 μl

*通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整引物浓度。

**ROX Reference Dye II(50x)比 ROX Reference Dye(50x)浓度低，使用 7500 /7500 Fast Real-Time PCR System 时，请使用 ROX Reference Dye II(50x)。使用 ABI PRISM 7300 Real-Time PCR System 和 StepOnePlus 时，请使用 ROX Reference Dye(50×)。

*** 20 μl 反应体系中，DNA 模板的添加量要在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时需要进行梯度稀释，以确定合适的 DNA 模板添加量。

如果欲使用本产品进行 Two-Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2、进行 荧光定量 PCR 反应

< Applied Biosystems 7300/7500 和 StepOnePlus Real-Time PCR System > 两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性 循环数: 1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应 循环数: 40

95°C 5 秒

60°C 30 ~ 34 秒*

Dissociation stage *

使用 StepOnePlus 时请设定在 30 秒。

使用 7300 时请设定在 31 秒。

使用 7500 时请设定在 34 秒。

<Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System> 两步法 PCR 扩增标准程序:

Stage 1: 预变性 循环数: 1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应 循环数: 40

95°C 3 秒

60°C 30 秒

Stage 3: Melt Curve

注意:

- 1) 本产品是利用 anti-Taq 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶, 与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比, 不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长, 会使酶的活性下降, 其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性, 通常设定为 95°C、30 秒。
- 2) 如果以上两步法程序得不到良好的实验结果时, 请再进行 PCR 条件的优化。由于使用 T_m 值较低的引物等原因, 两步法 PCR 反应扩增性能较差时, 可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

3、标准曲线制作和结果分析

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线, 进行 PCR 定量时制作标准曲线等。

分析方法参见仪器的操作手册。

实验条件优化:

如果按照推荐的两步法条件进行反应, 反应性能不好时, 请按照下面的方法进行引物和 PCR 反应条件的优化。另外, 根据反应情况选择特异性不同的 qPCRmix, 可提高 PCR 反应性能。实验条件选择时, 请从反应特异性与扩增效率两方面进行综合考虑。要求能同时满足这两个条件的反应体系, 才可以在较大浓度范围内进行很好的定量。

A、反应特异性高的实验体系应具备以下条件:

No Template Control 时不产生引物二聚体等非特异性扩增。

不产生目的片段以外的扩增。

B、扩增效率高的实验体系应具备以下条件:

扩增产物起峰更早 (C_t 值小)。

PCR 扩增效率高 (接近理论值 100%)。

C、降低 Primer 浓度有助于提高特异性; 提高 Primer 浓度有助于提高扩增效率。

D、要提高反应特异性, 可以提高退火温度。要提高扩增效率, 可以增加延伸时间或变为 3 Step PCR 反应。

E、预变性条件通常设定为 95°C 30 秒, 使用此条件对于难变性的环状质粒 DNA 和基因组 DNA 模板基

本上也能够很好的变性。如果对难变性的模板想改变变性条件，可以延长至 1~2 分钟。但是时间过长酶容易失活，不推荐使用 2 分钟以上的变性条件。

引物设计：

进行荧光定量 PCR 反应时，设计反应性能良好的 PCR 引物非常重要。根据以下原则，可以设计 PCR 扩增效率高，反应特异性强的良好引物。

PCR 扩增产物长度： 80~150 bp 较为合适（可以延长至 300 bp）。

设计引物要求如下：

A、引物长度： 17~25 mers

B、GC 含量： 40~60% (45~55%理想)

C、Tm 值： Forward Primer 和 Reverse Primer 的 Tm 值不能相差太大。

Tm 值的计算使用专用软件。 OLIGO： 63~68°C Primer3： 60~65°C

D、引物序列： A、G、C、T 整体分布尽量均匀。

不要有部分的 GC rich 或 AT rich（特别是 3'端）。

避开 T/C (Polypyrimidine) 或 A/G (Polypurine) 的连续结构。

E、3'末端序列：避免 GC rich 或 AT rich。

3'端碱基最好为 G 或 C。

尽量避免 3'末端碱基为 T。

E、互补序列：避开引物内部或两条引物之间有 3 个碱基以上的互补序列。

两条引物间的 3'末端避开有 2 个碱基以上的互补序列