

# SYBR® Green qPCR Mix

Cat. #: P2091, P2092, P2093, P2094, P2095

P2091a, P2092a, P2091b, P2092b

## 产品简介

SYBR® Green qPCR Mix 是 2X 浓缩的实时定量 PCR 预混液, 使用时只需加入模板和引物即可进行反应。本品含有基于核酸适配子 (Aptamer) 的抑制剂, 能够与 DNA 聚合酶可逆结合。当温度低于 45°C 时与聚合酶结合抑制其活性, 当温度达到 94°C 时与聚合酶分离激活酶活性, 从而可以减少引物二聚体和其他次级产物对反应的干扰。同时, 本品中的 DNA 聚合酶是经过化学修饰的热启动版的 Taq DNA 聚合酶, 在室温下活性被抑制, 从而可以避免非特异性延伸。采用这种双重热启动机制可以显著提高定量 PCR 的特异性。本品与绝大多数的定量 PCR 仪兼容, 如 ABI、Roche、Bio-Rad 等。

## 产品组成

Component	P2091 P2091a* P2091b*	P2092 P2092a* P2092b*	P2093	P2094	P2095
2X SYBR® Green qPCR Mix <sup>a</sup>	1 ml	1 ml × 5	1 ml × 10	1 ml × 50	1 ml × 100
超纯水	1 ml	1 ml × 5	-	-	-

a 包含 SYBR® Green I, Hotstart Taq DNA 聚合酶, Aptamer, dNTP 及反应缓冲液等。

\* P2091a, P2092a 中 ROX 含量为 0.2% (Low ROX), P2091b, P2092b 中 ROX 含量为 1% (High ROX), 其他规格不含 ROX。

## 保存条件

SYBR® Green qPCR Mix -20°C 避光保存 2 年, 4°C 避光可短期保存。ROX 4°C 避光可长期保存。

## 质量控制

纯度检测: 经质量检测, 产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测: 经不同来源的模板和引物检测, 产品具有优秀的特异性、灵敏性及可重复性等。

## 应用举例

### 1. 配制反应体系

Component	Volume	Final concentration
DNA template <sup>[1]</sup>	0.5-2 µl	1-4 µl Variable
Forward primer (10 µM) <sup>[2]</sup>	0.2 µl	0.4 µl 0.2 µM
Reverse primer (10 µM)	0.2 µl	0.4 µl 0.2 µM
2X SYBR® Green qPCR Mix <sup>[3]</sup>	5 µl	10 µl 1X
100X ROX Reference Dye <sup>[4]</sup>	Variable	Variable Variable
ddH <sub>2</sub> O	Variable	Variable -
Total volume <sup>[5]</sup>	10 µl	20 µl -

[1] DNA 模板建议用量 (10-20 µl 体系): 1-10 ng cDNA, 或 10-100 ng gDNA。加样体积不宜过小, 以免造成较大的误差, 但是 cDNA 的量不宜超过总体积的 1/10。因此模板建议浓度 (加样前): cDNA 1-10 ng/µl, gDNA 10-100 ng/µl。

[2] 引物终浓度建议范围: 0.2-0.6 µM。特异性差时可降低浓度, 效率低时可提高浓度。

[3] 如果溶解曲线出现杂峰, 可以减少 Mix 用量至 8 µl (20 µl 体系); 如果对痕量模板的检出率较低, 可以增加 Mix 用量至 12 µl (20 µl 体系)。

[4] 对于某些固定型号的仪器, 需要添加 ROX 才能精确测定 Ct 值。ROX 会给溶解曲线分析造成一定的背景干扰。因此, 为了避免 ROX 的杂峰背景干扰, 在应用软件的“Passive Reference Dye”中不要选择检测 ROX 荧光值选项, 然后再进行数据的收集与分析。由于 ROX 的使用体积较小, 建议将 ROX 提前与 qPCR Mix 混匀使用。ROX 用量参照具体仪器说明, 下表仅供参考。

Instruments	ROX (100X)
ABI PRISM 7000/ PRISM 7700/ 7300/ 7900HT/ Step One/ Step One Plus/ GeneAmp 5700	1% (High ROX)
ABI 7500/ 7500 Fast/ ViiA 7/ QuantStudio 6/7/12K Flex; Agilent Stratagene Mx3000P/ Mx3005P/ Mx4000	0.2% (Low ROX)
Bio-Rad CFX96/ CFX384/ iQ/ iQ5; MJ Research Opticon 2/ Chromo 4; Roche LightCycler 480/ 96; Corbett Rotor Gene G/ Q/ 3000/ 6000; Thermo PikoReal 96; Eppendorf MasterCycler ep realplex; Cepheid Smart Cycler	No ROX

[5] 建议总体积不小于 10 µl, 以免造成较大的加样误差。具体体积范围参考仪器说明。

## 2. 设定反应程序进行 qPCR 反应

注：本品含有热启动酶，在 60℃ 时会抑制酶活性，因此**不建议使用两步法**，推荐使用经典三步法或极速三步法。

经典三步法程序示例如下：

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	94℃	3 min	1
Denaturation	94℃	<b>15 sec</b>	40
Annealing	55-65℃ <sup>[1]</sup>	<b>15 sec</b>	
Extension	72℃	<b>20 sec</b>	
Dissociation/Melting curve analysis (optional) <sup>[3]</sup>			

本品可用极速三步法快速完成反应，程序示例如下：

Stage	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	94℃	3 min	1
Denaturation	94℃	<b>5 sec</b>	40
Annealing	55-65℃ <sup>[1]</sup>	<b>5 sec</b>	
Extension	72℃	<b>5-10 sec<sup>[2]</sup></b>	
Dissociation/Melting curve analysis (optional) <sup>[3]</sup>			

[1] 最适退火温度需要摸索。退火温度一般设定为所用引物的 T<sub>m</sub>-5℃，若低于 55℃，则以 T<sub>m</sub> 值为退火温度，一般不低于 55℃。

[2] 150 bp 以内的扩增子可设置为 5 sec；150-300 bp 的扩增子可设置为 10 sec；300 bp 以上的扩增子可适当延长延长时间。

[3] 不同仪器熔解曲线采集程序不同，一般按仪器默认熔解曲线采集程序即可。可在延伸（三步法）或退火延伸（两步法）阶段采集信号，也可在反应结束后 72 hrs 之内采集（避光低温保存）。

## 3. 分析结果

观察扩增曲线；调整基线，计算 Ct 值；观察熔解曲线检测特异性；进行相对或绝对定量。

### 注意事项

- ① 使用前 Mix 需要完全解冻，充分混匀。尽量避免多次反复冻融。短期使用可避光保存于 4℃。
- ② 将 (n+x) 份反应液混匀后再分注到 n 个单管中，可降低加样误差。（n 为重复次数，x 为损耗量，一般为 n 的 1/10）
- ③ ABI 的定量仪器大部分需要 ROX 校正管间差异，Bio-Rad 的定量仪器不需要 ROX 校正。具体仪器请参照其使用说明。
- ④ 轻轻混匀反应液，避免产生气泡，气泡会干扰荧光检测。可瞬时离心去除气泡。
- ⑤ 引物的特异性、用量以及退火温度是影响实验结果的重要因素。务必设计特异性好的引物，随实验结果适当调整引物用量（0.05-0.9 μM）——特异性较差时减少引物用量，或以 3℃ 为增量提高退火温度，扩增效率较低时增加引物用量。
- ⑥ DNA 模板的量应小于 500 ng/反应，过高的模板量会引起非特异性扩增。应根据模板类型与基因表达量适当调整用量。
- ⑦ 熔解曲线的采集不是必须的，初次使用的引物建议进行熔解曲线采集。熔解曲线可以看出产物的特异性。产物特异性不好的原因有：引物特异性低；退火温度设置偏低；引物/模板浓度偏高；等。同时，建议通过琼脂糖凝胶电泳检测产物的特异性。

### 相关产品

名称	货号	规格
PCR Mix	P2011/P2012/P2013/P2014/P2015	1ml/5ml/10ml/50ml/100ml
Power Green qPCR Mix	P2101/P2102/P2103/P2104/P2105	1ml/5ml/10ml/50ml/100ml
1kb ladder	M1181/M1182	50 次/250 次
DST <sup>TM</sup> 5000	M1111/M1112	60 次/300 次
高纯度质粒小提试剂盒	N1011/N1012/N1013	50 次/100 次/200 次
通用 RNA 提取试剂盒	R1051	50 次
基因组 DNA 快速提取试剂盒	N1111/N1112	50 次/100 次
DNA 凝胶回收试剂盒	N1071/N1072/N1073	50 次/100 次/200 次
RT-PCR Kit	R1011/R1012	20 次/100 次

更多 PCR 酶、DNA Marker 及核酸提纯类产品请登录东盛生物官网查询。