

目录

产品组成	1
产品储存与有效期	1
用户需自备的试剂和物品	1
技术支持	1
产品介绍	2
产品原理	2
注意事项	3
操作方法	4
实验条件的选择	6
常见问题分析	7
质量标准	9
附录：引物设计	9

产品组成

Cat. No.	7106100	7106500
2×SYBR Green PCR Mix*1	1 ml	1 ml×5
50×ROX Reference Dye*2	40 µl	200 µl
ddH ₂ O	1 ml	1 ml×5
说明书	1 份	1 份

*1. 包含热启动Taq DNA Polymerase, dNTP Mix, Mg²⁺, SYBR Green I及其他PCR增强剂。

*2. 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

使用Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; Applied Biosystems StepOne™, StepOnePlus™等其他需要添加高浓度ROX Reference Dye的荧光定量PCR仪时, 50 × ROX Reference Dye的添加量为PCR反应体系的1/50; 使用Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA™7, Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™等其他需要添加低浓度ROX Reference Dye的荧光定量PCR仪时, 50 × ROX Reference Dye的添加量为PCR反应体系的1/250; 下列是不需要添加ROX Reference Dye的荧光定量PCR仪: Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™, Cepheid SmartCycler®, Eppendorf Mastercycler®ep realplex, realplex 2, Illumina Eco qPCR, Qiagen/Corbett Rotor-Gene®Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000, Roche Applied Science LightCycler™480, Thermo Scientific PikoReal Cyclers等。

产品储存与有效期

- 20°C避光保存, 有效期 2 年。

用户需自备的试剂和物品

1. PCR 引物 (引物设计请参考第 9 页“附录: 引物设计”)
2. DNA 或 cDNA 模板
3. 适用于荧光定量 PCR 的单管、8 联排管、或 96 孔 PCR 管(板)
4. 移液器及吸头
5. Real Time PCR 扩增仪 (授权仪器)

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部: QQ: 869912443, 微信公众号: simgenbio, e-mail: technical@simgen.cn, 电话: 400-0099-857。

产品介绍

本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂，主要用于基因组 DNA 靶序列和 RNA 反转录后 cDNA 靶序列的检测。2×SYBR Green PCR Mix 是一种 2×浓度的预混合液，进行实验时 PCR 反应液的配制十分方便简单，只需取 0.5 倍的 PCR 体系体积的 2×SYBR Green PCR Mix，加入引物和模板，以 ddH₂O 补足体积即可。

本产品适合快速 Real Time PCR 扩增反应，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，快速、准确的对靶基因进行准确检测、定量，特异性强，重复性好，可信度高。所含的荧光染料 SYBR Green I 可以与所有的双链 DNA 结合，使该产品可用于不同靶序列的检测而不需合成特异性标记探针。产品使用了含 Taq 酶抗体的高效热启动 Taq DNA Polymerase，在常温下没有聚合酶活性，有效避免在常温条件下由引物和模板非特异性结合或引物二聚体而产生的非特异性扩增。独特的 PCR 缓冲体系与热启动酶的组合，以及产品中含有的 PCR 增强剂和蛋白稳定剂，最大限度地提高 PCR 的扩增效率和特异性，可进行高灵敏度、高精度的 Real Time PCR 扩增反应。所含的 ROX 染料可校正定量 PCR 仪孔与孔之间产生的荧光信号误差，适用于以 ROX 作为校正染料的荧光定量 PCR 仪。

产品原理

本产品在进行PCR扩增后，通过检测反应液中SYBR Green I的荧光强度，达到监控PCR产物扩增量的目的。

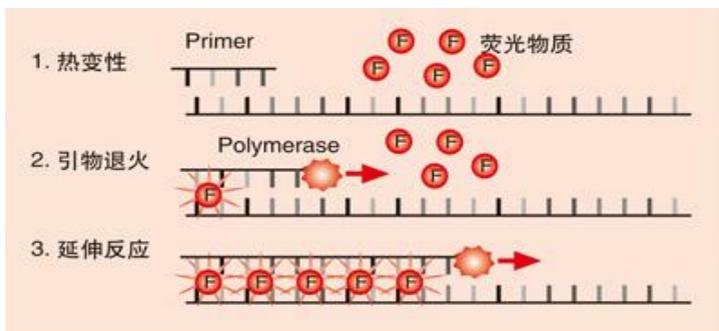
1. PCR

PCR是以微量DNA进行目的片段扩增的方法。通过DNA链的热变性、引物退火、DNA聚合酶作用下引物的延伸三个步骤循环往复，可在短时间内扩增DNA达100万倍以上。

本产品中的DNA聚合酶采用了比Taq DNA Polymerase扩增效率更高的Hot Start Taq DNA Polymerase，可以在更短时间内进行高灵敏度的检出，并能有效防止在热循环前由引物错配或引物二聚体产生的非特异性扩增。

2. 嵌合荧光检测法

SYBR Green I与双链DNA结合后会发出荧光，所以可以通过检测反应体系中的SYBR Green I荧光强度，达到检测PCR产物扩增量的目的。具体原理见下图。通过PCR反应生成双链DNA，SYBR Green I与双链DNA结合发出荧光，通过检测PCR反应液中的荧光信号强度，可以对目的基因进行准确定量，同时还可以测定扩增的目的DNA片段的熔解温度。



注意事项

- 使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
 - 请勿涡旋振荡混匀。
 - 2×SYBR Green PCR Mix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。
- 本产品中含有SYBR Green I荧光染料和ROX染料，保存本产品或配制PCR反应液时应避免强光照射。
- 避免反复冻融本产品，反复冻融可能使产品性能下降。
- 本产品不能用于探针法荧光定量PCR。
- 配制反应液时，请使用洁净的的吸头（推荐使用带滤芯的吸头）和离心管，尽量防止污染。
- 配制反应液时，试剂请于冰上放置。

操作方法

1. 按下列组分配制PCR反应液（反应液配制请在冰上进行）

① 使用Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne™, StepOnePlus™等其他需要**添加高浓度ROX Reference Dye**的荧光定量PCR仪时, 50×ROX Reference Dye的添加量为PCR反应体系的1/50, 按下表配制:

试剂	使用量	使用量	终浓度
2×SYBR Green PCR Mix	10 µl	25 µl	1×
Forward Primer (10 µM)	0.4 µl	1 µl	0.2 µM ^{*1}
Reverse Primer (10 µM)	0.4 µl	1 µl	0.2 µM ^{*1}
50×ROX Reference Dye	0.4 µl	1 µl	1×
DNA模板	2 µl ^{*2}	5 µl ^{*2}	
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	6.8 µl	17 µl	
Total	20 µl ^{*3}	50 µl ^{*3}	

② 使用Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio™ 3, 5, 6 Flex, 7 Flex, 12K Flex, Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™等其他需要**添加低浓度ROX Reference Dye**的荧光定量PCR仪时, 50×ROX Reference Dye的添加量为PCR反应体系的1/250, 可用ddH₂O将50×ROX Reference Dye稀释5倍(例如: 取10 µl 50×ROX Reference Dye, 加入40 µl ddH₂O混合均匀即可)后按上表用量配制, 若不稀释则按下表配制:

试剂	使用量	使用量	终浓度
2×SYBR Green PCR Mix	10 µl	25 µl	1×
Forward Primer (10 µM)	0.4 µl	1 µl	0.2 µM ^{*1}
Reverse Primer (10 µM)	0.4 µl	1 µl	0.2 µM ^{*1}
50×ROX Reference Dye	0.08 µl	0.2 µl	0.2×
DNA模板	2 µl ^{*2}	5 µl ^{*2}	
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	7.12 µl	17.8 µl	
Total	20 µl ^{*3}	50 µl ^{*3}	

③ 使用Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™, Cepheid SmartCycler®, Eppendorf Mastercycler®ep realplex, realplex 2, Illumina Eco qPCR, Qiagen/Corbett Rotor-Gene®Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000, Roche Applied Science LightCycler™ 480, Thermo Scientific PikoReal Cycler等其他**不需要添加ROX Reference Dye**的荧光定量PCR仪时, 按下表配制:

试剂	使用量	使用量	终浓度
2×SYBR Green PCR Mix	10 μl	25 μl	1×
Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	1 μl	0.2 μM ^{*1}
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl	1 μl	0.2 μM ^{*1}
DNA模板	2 μl ^{*2}	5 μl ^{*2}	
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	7.2 μl	18 μl	
Total	20 μl ^{*3}	50 μl ^{*3}	

*1 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。

*2 在20 μl反应体系中，DNA模板的添加量通常在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，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的DNA模板添加量。如果欲使用本产品进行两步法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反应总体积的10%。

*3 按照各仪器推荐体系进行反应液配制。

2. 进行Real Time PCR反应

PCR反应管请用离心机低速离心数秒后放入PCR仪中进行Real Time PCR反应。建议采用下表的两步法PCR反应程序，如果该程序得不到良好的实验结果，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。有关PCR的具体反应条件请参照第6页“实验条件的选择”。

阶段	循环数	温度	时间	内容	荧光信号采集
Stage 1	1	95°C	30秒 ^{*1}	预变性	否
Stage 2	40	95°C	5~10秒 ^{*2}	变性	否
		60°C	20~30秒 ^{*3}	退火+延伸	是
Stage 3	熔解曲线分析 (Melt Curve/Melting/Dissociation Curve Stage) ^{*4}				

*1 本产品中使用的是含Taq酶的Hot Start Taq DNA Polymerase，与其他公司的化学修饰型Hot Start DNA聚合酶相比，不需要PCR反应前的95°C、5~15分钟的酶的活化反应。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。因此在PCR反应前进行模板的预变性，通常设定为95°C、30秒。

*2 变性时间在5~10秒内均可，请根据不同型号仪器的使用要求进行时间设定。

*3 退火+延伸时间在20~30秒内均可，请根据使用的仪器所需要的数据采集最短时间限制自行进行调整（例如：使用ABI 7700和7900HT时至少需要30秒；使用ABI 7000和7300时至少需要31秒）。

*4 使用仪器默认的熔解曲线采集程序。

3. 实验结果分析

反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线和熔解曲线，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。

实验条件的选择

如果按照推荐的两步法条件进行反应效果不佳时，请按照下面的方法进行引物和PCR反应条件的研讨。

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。

◆反应特异性高的实验体系应具备以下条件：

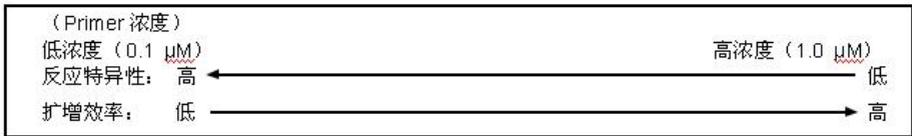
- NTC(No Template Control, 阴性对照) 不产生引物二聚体等非特异性扩增。
- 不产生目的片段以外的扩增。

◆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 (Ct值小)。
- PCR扩增效率高 (接近理论值100%)。

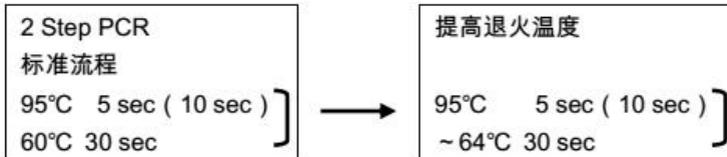
1. Primer 浓度与反应性能间的关系

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。图示如下：

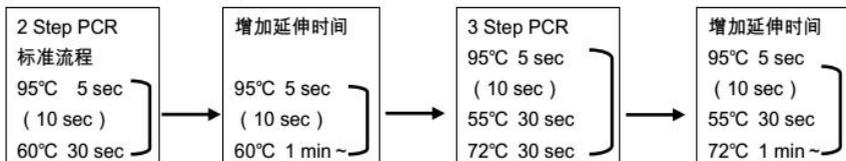


2. PCR条件与反应性能间的关系

① 要提高反应特异性，可以适当的提高退火温度：



② 要提高扩增效率，可以适当的增加延伸时间或变为3 Step PCR反应：



③ 预变性：

预变性条件通常设定为95°C 30 sec，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。

常见问题分析

1. 无 CT 值（信号）出现

① 模板量不足或模板降解。对未知浓度的样品应从系列稀释样本的最高浓度做起，并避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。

② 引物降解。可通过 PAGE 电泳检测其完整性。

2. 阴性对照也出现明显的扩增曲线

① 试剂或环境被污染。不要在加样区打开反应结束的 PCR 管。

② 引物二聚体的出现。SYBR Green 法荧光 PCR 在 35 cycles 以后阴性出现扩增曲线属正常情况，配合溶解曲线分析一般可确认不是目的基因的扩增。若是 30 cycles 之前阴性出现扩增曲线，说明有较严重的引物二聚体产生，应重新设计合适的引物。

③ 如果使用了 ROX 校正，则有可能是 ROX 的降解所造成。ROX 应避光 - 20°C 保存，若长期不用，请放置 - 80°C 避光保存。

3. 溶解曲线不止一个主峰

① 引物设计不够优化。应避免引物二聚体和发夹结构的出现。

② 引物浓度不佳。适当降低引物的浓度，并注意上下游引物的浓度配比。

③ 模板有基因组的污染。RNA 提取过程中避免 DNA 的引入，或通过引物设计避免非特异性扩增。

4. 实验重复性不好

① 加样不准确。

② 仪器在样品上温度条件有差异，即温度均一性不好。尽量将样品放在仪器中间位置，避免边缘效应。

③ 模板浓度低。样品初始浓度越低，重复性越差，应减少样品的稀释倍数。

5. 扩增效率低

① 反应试剂中部分成分特别是荧光染料降解。2×SYBR Green PCR Mix 应避光 - 20°C 保存，若长期不用，请放置 - 80°C 避光保存。

② 反应条件不够优化。可适当降低退火温度或改为三步扩增法。

③ 反应体系中有 PCR 反应抑制物。一般是加入模板时所引入，应先把模板适度稀释，再加入反应体系中，减少抑制物的影响。

6. 扩增曲线不正常，刚进入指数期就很快进入平台期并向右下弯曲

① 基线等设置不当。按仪器说明书重新操作。

② 模板量过多。当扩增曲线在 10 个循环内起峰时，应将模板稀释 100—1000 倍后使用。

7. 荧光定量 PCR 时 CT 值一般大于多少时认为模板无扩增

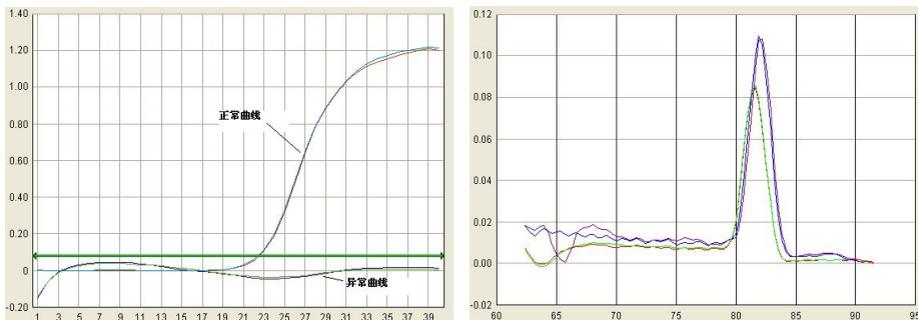
当进入对数期的循环数大于 35 时，Real Time RT-PCR 检测无效，基因没有表达；当进入对数的循环数在 32 - 35 个循环时，需要有至少 3 个重复才能判断是否能检测到基因的表达。

8. 荧光曲线的荧光值忽然变低

- ① 2×SYBR Green PCR Mix 过保质期，其中的 SYBR Green I 分解严重。
- ② 仪器盖子未关紧。注意检查仪器是否盖紧。
- ③ 卤钨灯（halogen lamp）使用过度，影响荧光采集。建议更换卤钨灯。
- ④ PCR 管的透光度对荧光值的影响。
- ⑤ 配置反应体系时未将 mix 混匀以致成分不均匀。

9. PCR 结果出现异常

- ① 如下图：荧光曲线异常，熔解曲线正常。



这是因为合成 cDNA 第一链时有过多 cDNA-RNA 杂合链合成，以致扩增过程中 SYBR Green I 与之结合，导致荧光曲线异常。建议使用特异性引物代替 oligo dT 和随机引物，或者适当减少 cDNA 模板或者是 RNA 模板的用量。

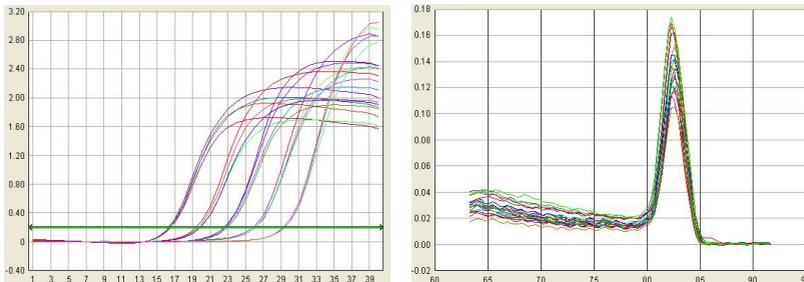
- ② 在做 DNA 模板梯度时，PCR 结果无梯度相关性。
 - A. CT 值均在 15 左右：这是由于原始模板浓度过高，稀释浓度不够，建议继续按 10 倍梯度稀释，直至 CT 值在 15 之后；
 - B. CT 值在 15-35 之间：可能有模板 DNA 污染或扩增产物污染，或是引物设计不够完美，建议更换试剂、清洁环境或重新设计引物；
 - C. CT 值均在 35 之后：模板浓度太低以致出现非特异性扩增，建议重新提取模板。

质量标准

使用ABI Prism 7000 Sequence Detection System PCR扩增仪，以Human β -actin cDNA为模板（扩增片段大小：205 bp）进行Real Time PCR反应，获得了良好的检测结果。

引物序列（ β -actin F: TGACGTGGACATCCGCAAAG

β -actin R: CTGGAAGGTGGACAGCGAGG）



附录：引物设计

进行Real Time 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、反应特异性强的引物。

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

◆ 设计引物要求如下：

引物长度	17~25 mers
GC含量	40~60%（45~55%最佳）*1
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*2：63~68°C Primer 3：60~65°C
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
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
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 二条引物间的3'末端避开有2个碱基以上的互补序列
特异性	使用BLAST*3检索确认引物的特异性

*1. 使用本产品对GC rich目的片段进行扩增时，设计GC含量为45-65%（50-60%最佳）

*2. OLIGO™Primer Analysis Software(Molecular Biology Insights)

*3. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>