

## SYBR Green Master Mix

### 荧光定量 PCR 试剂盒 (SYBR Green)

产品编号	产品名称	规格
BL705A	荧光定量 PCR 试剂盒 (SYBR Green)	5X1mL

**别名:** SYBR Green 荧光定量 PCR 预混液

**产品简介:**

本产品是使用 SYBR® Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 反应的专用预混液。核心组分为一种新型的抗体法热启动 DNA 聚合酶，具有特异性强、检测灵敏度高等诸多优点，配以针对 qPCR 优化的最适 Buffer，非常适合于进行高特异性、高灵敏度的 qPCR 反应。本产品是一种含有 qPCR 反应最适浓度 SYBR® Green I 的 2×预混液，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因定量准确、重复性好、可信度高。同时，优化的预混液可缩短 Real-Time PCR 的反应时间，适用于标准或快速 PCR 仪。

**产品组分:**

产品编号	产品名称	规格
1	2×qPCR MasterMix (SYBR Green)	5×1mL
2	50×ROX Reference Dye	1ml
3	RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	5ml

**保存条件:**

收到本产品后，请立即置于-20℃避光保存，至少一年有效。从-20℃取出使用时，将冻存的 qPCR MasterMix 和 ROX Reference Dye 融解，然后轻轻颠倒混匀，待溶液完全均一后再行使用。如解冻后没有使用，须彻底混匀后重新冷冻。(在解冻过程中盐会出现分层现象，如未混匀进行冷冻，盐晶体的析出将会对酶造成损害)。如需一段时间内经常取用，可在 2~8℃条件下储存 3 个月。避免反复多次冻融。

**使用说明:**

**一、配制 Real-Time PCR 反应体系:**

- 1、将所有试剂 qPCR MasterMix，ROX Reference Dye，模板，引物和 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，在室温下溶解并彻底混匀。
- 2、建议置于冰上进行 Real-Time PCR 反应液的配制。

参考下表配制反应体系:

组分	20ul 体系	25ul 体系	50ul 体系	终浓度
qPCR MasterMix	10μl	12.5 μl	25 μl	1×
正向引物 (10 μM)	0.6 μl	0.75 μl	1.5 μl	300 nM*
反向引物 (10 μM)	0.6 μl	0.75 μl	1.5 μl	300 nM*
cDNA 模板	—	—	—	--
ROX Reference Dye	—	—	—	—
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	至 20 μl	至 25 μl	至 50 μl	—

\* 一般来说反应体系中引物终浓度为 300 nM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度 200-500 nM 范围内调整引物浓度。

\* 几种常见仪器的最适 ROX Reference Dye 浓度见下表：

仪器型号	使用浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/StepOne 等	5×
ABI 7500/7500 Fast、QuantStudio® 3/5、QuantStudio 6/7 Flex、ViiA 7、Stratagene Mx3000P/Mx3005P和Mx4000等	1×
Roche、Bio-Rad 等品牌仪器	无需添加

3、盖上反应管，轻柔混匀。可瞬时离心，确保所有样品均在管底。

## 二、进行 Real-Time PCR 反应

建议采用两步法 PCR 反应程序进行反应。

若模板量较低等因素导致扩增效果不佳，可使用三步法程序进行 PCR 反应。

两步法反应程序：

步骤	温度	持续时间	循环数
预变性	95℃	1min	1
变性	95℃	5sec	40
退火延伸数据采集	60℃	15sec	40
溶解曲线分析	根据仪器推荐程序设置		

三步法反应程序：

步骤	温度	持续时间	循环数
预变性	95℃	1min	1
变性	95℃	5sec	40
退火	50-60℃	10sec	40
延伸数据采集	72℃	15sec	40
溶解曲线分析	根据仪器推荐程序设置		

\* 请先使用 60℃ 15 sec 进行扩增。如果需要进一步优化，可以尝试在 56-66℃ 范围内进行。

\* 使用不同型号仪器进行时间设定时，请按照仪器使用说明书要求进行实验操作，几种常见仪器的时间设定见下表：

使用 ABI7500 时请设定在 32 sec。

使用 ABI 7000 和 7300 时请设定在 31 sec。

使用 ABI 7700/7900HT/7500 Fast, Roche, BioRad 和 Agilent 等公司荧光定量 PCR 仪时请设定在 15sec。

\* 通常引物退火温度比引物的解链温度(T<sub>m</sub>)低 5℃，如果引物碱基数较少，可以适当提高退火温度，这样可以使 PCR 的特异性增加；如果碱基数较多，那么可以适当减低退火温度。

## 常见问题

### 1、无扩增信号或扩增曲线起峰晚或仅有引物二聚体

原因	解决办法
DNA 模板中存在抑制剂	重新纯化模板或降低模板使用量
Mg <sup>2+</sup> 浓度不合适	使用 qPCR MasterMix 时, PCR 反应体系中 Mg <sup>2+</sup> 的终浓度为 2 mM。对有些扩增体系, 可以将 Mg <sup>2+</sup> 终浓度提高到 5 mM。进行 Mg <sup>2+</sup> 终浓度优化时, 建议每次增加 0.5 mM Mg <sup>2+</sup> 浓度进行实验。
PCR 条件、引物序列或浓度不当	请确认引物未发生降解, 引物浓度及 PCR 条件, 扩增不好时, 通常先尝试降低退火温度, 延长退火时间和提高引物浓度, 有时也可以提高退火温度, 增加延伸时间, 降低升温速度。对于 GC 含量高的模板, 可以适当延长变性时间。如果还是扩增不好, 请重新设计引物。
起始模板问题	检查起始模板的浓度, 保存条件和质量。重新对模板进行线性梯度稀释, 并用新稀释模板进行实验。增加起始模板使用量。
加样错误或试剂问题	检查试剂浓度和保存条件, 包括所使用的引物和模板。重复进行实验。

### 2、NTC 出现较高的荧光值

原因	解决办法
试剂污染	建议使用新试剂进行实验。
PCR 反应液配制时发生污染	采取必要的防污染策略 (如使用带滤芯的枪头)。
引物出现降解	可以使用变性聚丙烯酰胺胶检测引物降解情况。

### 3、出现引物二聚体和 (或) 非特异扩增

原因	解决办法
Mg <sup>2+</sup> 浓度不合适	使用 qPCR MasterMix 的反应体系含有 Mg <sup>2+</sup> 的终浓度为 2 mM。对有些扩增体系, 可以将 Mg <sup>2+</sup> 终浓度增加到 5 mM。建议每次增加 0.5 mM Mg <sup>2+</sup> 浓度进行优化。
PCR 退火温度太低	建议每次增加 2℃ 进行退火温度优化。
引物设计不合适	考虑重新设计引物序列。
PCR 产物太长	荧光定量 PCR 产物长度最好在 100-150 bp 之间, 而且不应该超过 500 bp。
引物出现降解	可以使用变性聚丙烯酰胺胶检测引物降解情况。
计量误差	反应体积太小会导致检测精度下降。请根据定量 PCR 仪推荐的反应体积重新实验。

#### 4、定量值重现性差

原因	解决办法
仪器方面的故障	因为仪器的不适用，在温度管理或检测时产生重现性差。请根据相应仪器的说明书进行点检。
样品纯度不好	不纯的样品会导致实验的重现性差。
稀释的模板放置太久	通过梯度稀释的模板最好现配现用。
引物质量下降	尽量避免新合成引物批次间的差异，可以使用原来质量好的引物做为对照。
PCR 反应条件、引物浓度、序列等不恰当	扩增效率差的 PCR 容易产生重现性差。通过变更引物的浓度或 PCR 反应条件来进行调整。扩增不好时，一般可降低退火温度或提高引物浓度，也可以延长延伸时间。如模板的 GC 含量较高，可延长变性时间。仍得不到改善时，建议重新设计引物。
计量误差	反应体积太小会导检测精度下降。请根据定量 PCR 仪推荐的反应体积重新实验。

#### 注意事项：

1、本产品中含有荧光染料 SYBR Green I，保存本产品或配制 PCR 反应液时应避免强光照射。

2、如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。使用时请上下颠倒轻轻混匀，请不要使用振荡器进行混匀，尽量避免出现泡沫，并经瞬时离心后使用。

3、引物纯度对反应特异性影响很大，建议使用 PAGE 级别以上纯化的引物。

4、引物终浓度为 0.3  $\mu\text{M}$  可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。如果需要进一步优化，可以在 0.2-0.5  $\mu\text{M}$  范围内调整引物浓度。

5、20  $\mu\text{l}$  反应体系中，cDNA 模板的使用量一般小于 100 ng，基因组 DNA 模板量一般小于 50 ng，逆转录产物作为模板时，使用量应不超过 PCR 体系终体积的 20%。

6、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。