

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 ddH2O	5ml

保存条件:

收到本产品后, 请立即置于-20 °C 避光保存。从-20 °C 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°C 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 ddH₂O, 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	10 μ l	12.5 μ l	25 μ l	1 \times
正向引物 (10 μ M)	0.6 μ l	0.75 μ l	1.5 μ l	300 nM*
反向引物 (10 μ M)	0.6 μ l	0.75 μ l	1.5 μ l	300 nM*
cDNA 模板	-	-	-	--
ROX Reference Dye	-	-	-	-
RNase-Free ddH ₂ O	至 20 μ l	至 25 μ l	至 50 μ l	-

* 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; Stratagene Mx3000P、Mx3005P 和 Mx4000 等	1×
Roche, Bio-Rad, Eppendorf 等品牌仪器	无需添加

2、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°C	1min	1
变性	95°C	5sec	40
退火延伸数据采集	60°C	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°C	1min	1
变性	95°C	5sec	40
退火	50-60°C	10sec	40
延伸数据采集	72°C	15sec	40
溶解曲线分析	根据仪器推荐程序设置		

* 请先使用 60°C 15 sec 进行扩增。如果需要进一步优化, 可以尝试在 56-66°C 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_m)低 5°C, 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 ²⁺ 浓度 不合适	使用 qPCR MasterMix 时, PCR 反应体系中 Mg ²⁺ 的终浓度为 2 mM。对有些扩增体系, 可以将 Mg ²⁺ 终浓度提高到 5 mM。进行 Mg ²⁺ 终浓度优化时, 建议每次增加 0.5 mM Mg ²⁺ 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 ²⁺ 浓度不合适	使用 qPCR MasterMix 的反应体系含有 Mg ²⁺ 的终浓度为 2 mM。对有些扩增体系，可以将 Mg ²⁺ 终浓度增加到 5 mM。建议每次增加 0.5 mM Mg ²⁺ 浓度进行优化。
PCR 退火温度太低	建议每次增加 2°C 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 较容易产生重现性差。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 μM 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 μM 范围内调整引物浓度。
- 5、20 μl 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。