

2×SYBR Green PCR Master Mix 使用说明书

产品概述

2×SYBR Green PCR Master Mix 是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。含有常温下完全封闭 Taq 酶活性的热启动酶 HS Taq DNA Polymerase, 能够有效抑制低温条件下引物非特异性退火或者引物二聚体引起的非特异性扩增, 提高扩增反应的特异性。本试剂经过特殊配制, 采用优化配方的 qPCR 专用 Buffer, 大大提高了 qPCR 反应的扩增效率和检测灵敏度, 可以在较宽的定量区域内得到良好的标准曲线, 准确进行定量。本试剂与多数厂家的荧光定量 PCR 仪兼容, 如 Applied Biosystems、Eppendorf、Bio-Rad 和 Roche 等。

产品组成	A4004S	A4004M
2×SYBR Green PCR Master Mix	1 mL	5×1 mL
ROX Reference Dye I (50×)	40 µl	200 µl
ROX Reference Dye II (50×)	40 µl	200 µl

储存条件:

本产品-20℃保存有效期至少一年, 4℃可保存3个月。解冻后应充分混匀, 避免产生大量气泡。

试剂原理:

本产品利用热启动酶 HS Taq DNA polymerase 进行 qPCR 扩增反应, 通过扩增产物嵌合 SYBR Green I 而激发的荧光信号强度进行检测。

1、PCR

PCR 法是以微量 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, 可在短时间内扩增大量 DNA 片段。

2、荧光检出

SYBR Green I 是一种结合与小沟中的双链 DNA 结合染料, 与双链 DNA 结合后, 其荧光大大增强, 最大吸收波长约为 497nm, 发射波长最大约为 520nm。

SYBR Green I 可以与所有的双链 DNA 相结合, 无需使用探针, 即可实现检测, 通用性好, 且灵敏度很高。但是, 由于 SYBR Green I 与所有的双链 DNA 相结合, 因此由引物二聚体、单链二级结构以及错误的扩增产物引起的假阳性会影响定量的精确性。在定量仪器检测过程中, 可以通过测量升高温度后荧光的变化, 由解链曲线来分析产物的均一性, 从而区分产物的熔解峰温度而区分特异与非特异的产物。

使用方法:

反应条件

1、 两步法

热启动: 95°C 10 分钟;

变 性: 95°C 10~20 秒;

退火/延伸: 60°C 20~60 秒。 } 35 ~ 45 个循环

熔解曲线分析。

2、 三步法

热启动: 95°C 10 分钟;

变 性: 95°C 10~20 秒;

退 火: 56-64°C 10~30 秒; } 35 ~ 45 个循环

延 伸: 72°C 10~60 秒。

熔解曲线分析。

对于 Roche LightCycler480, 热启动时间应采用 10min, ABI7500 也可以采用 5min 热启动。

qPCR反应体系配制:

建议的模板量 10 ~ 100ng (基因组 DNA) 或 1 ~ 10ng (cDNA 模板)。

试剂	20µl 体系	50µl 体系	终浓度
2×SYBR Green PCR Master Mix	10µl	25µl	1×
Primer 1 (10µM)	0.4 ~ 2µl	1 ~ 5µl	0.2 ~ 1.0µM
Primer 2 (10µM)	0.4 ~ 2µl	1 ~ 5µl	0.2 ~ 1.0µM
Template DNA	4µl	10µl	-
ROX Reference Dye (optional)	0.4µl	1µl	1×
ddH ₂ O	Variable	Variable	-
Total volume	20µl	50µl	-

适用机型:

以下机型无需使用ROX Reference Dye校正:

➤ Roche LightCycler 480, Roche Light Cyclus 96, MJ Research Chromo4, MJ Research Opticon 2, Takara TP-800, Bio-Rad iCycler iQ, Bio-Rad iCycler iQ5, Bio-Rad CFX96, Bio-Rad C1000 Thermal Cyclus, Thermo Scientific Pikoreal 96, Qiagen Corbett Rotor-Gene 6000, Qiagen Corbett Rotor-Gene G, Qiagen Corbett Rotor-Gene Q, Qiagen Corbett Rotor-Gene 3000, Mastercyclus ep realplex。

以下机型进行ROX Reference Dye校正模式, 需额外添加校正染料:

➤ 使用 ROX Reference Dye I (50×) 的 PCR 仪 (使用时终浓度为 1×)

ABI Prism 7000/7300/7700/7900, ABI Step One, ABI Step One Plus, ABI 7900HT, ABI 7900HT Fast StepOnePlus Real-Time PCR System。

➤ 使用 ROX Reference Dye II (50×) 的 PCR 仪 (使用时终浓度为 1×)

ABI Prism 7500, ABI Prism 7500 Fast, ABI QuantStudio DX/3/5, ABI QuantStudio 6/7/12K Flex, ABI ViiA 7, Stratagene Mx3000P/Mx 3005P/Mx 4000。