使用前请仔细阅读说明书　　版本号：202010

2×SYBR Green qPCR Mix

目录号：EH003　**规格：**1 ml　**保存：**-20℃避光保存，有效期至少一年。

产品简介：

本产品是采用 SYBR Green I 染料嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂，含有抗体封闭型热启动酶，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。本产品具备扩增效率高、检测特异性及灵敏度强、稳定性好、操作使用简便等特点，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，同时与多数厂家的荧光定量 PCR 仪兼容，如 Applied Biosystems、Eppendorf、Bio-Rad 和 Roche 等。

试剂内容：

2×SYBR Green qPCR Mix　　1 ml

自备：

ROX Reference Dye I（50×）

ROX Reference Dye II（100×）

注意：

ROX Reference Dye 用以校正部分公司 Real Time PCR 扩增仪的孔间荧光信号误差。

ROX Reference Dye I (50×) 适用于：ABI PRISM 7000/ 7700/ 7300/ 7900HT、Step One Plus Real-Time PCR System。

ROX Reference Dye II (100×) 适用于：7500 Real-Time PCR System、7500 Fast Real -Time PCR System、Stratagene Mx3000P、Mx3005P、Mx4000。

ROX Reference Dye I、II 反应终浓度均为 1×。

LightCycler、Thermal Cycler Dice Real Time System II、Smart Cycler System 等 Real Time PCR 扩增仪不需使用。

操作方法：

1）配制 PCR 反应体系：

解冻后使用前应充分颠倒混匀，瞬时离心后使用，避免产生大量气泡，请勿涡旋振荡混匀。避免反复多次冻融，若经常使用请避光保存在 4℃。反应液的配制、分装时请使用新的（无污染的）枪头、离心管等，尽量避免污染。

按下列组份配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）：

Web: www.sanshibio.com
Email: sanshibio@126.com
Tel : 0311-82970259

试剂	25 μl 体系	终浓度
2×SYBR Green qPCR Mix	12.5 μl	1×
Primer 1 (10 μM)	0.5-2.5 μl	0.2-1.0 μM
Primer 2 (10 μM)	0.5-2.5 μl	0.2-1.0 μM
ROX Reference Dye I or ROX Reference Dye II	0.5 μl or 0.25 μl	1×
Template DNA	2 μl as required	-
ddH_2O	Up to 25 μl	-

注意：

1、请根据引物选择合适的退火（延伸）温度，通常引物的 T_m 值设计在 60℃左右；对于退火温度较低的引物，建议采用三步法；使用的引物终浓度可在 0.2～1.0 μM 范围内调整；DNA 模板可根据浓度进行适当调整。

2、SYBR Green I 染料是非特异性染料，可与双链 DNA（dsDNA）结合后发出荧光，同时其强光下易分解，因此在设计引物时需要尽量避免引物二聚体的产生，使用时避免长时间强光照射，以提高检测结果准确性、灵敏度及特异性。

3、提高镁离子浓度可以降低 SYBR Green I 对 PCR 反应的抑制作用，建议在使用本产品进行荧光 PCR 反应优化时，可适当增加镁离子浓度（比普通 PCR 反应高出 0.5-3.0 mM）。

4、扩增前后要使用专用的区域和移液器，戴手套操作并经常更换，PCR 反应完成后切勿打开反应管。以最大限度的减少 PCR 产物对检测环境的污染。

2）PCR 反应程序：

通常情况下，可以采用两步法进行反应；如果两步法扩增不理想，可以采用三步法设置 PCR 反应程序。

方法/步骤	两步法 real-time PCR	三步法 real-time PCR	循环数
95℃（预变性）	2-5 min	2-5 min	1
95℃（变性）	10 sec	10 sec	35-45 Cycles
55℃-60℃（退火）	20 sec - 1 min（采集荧光）	10-20 sec	
72℃（延伸）	—	20 sec - 1 min（采集荧光）	
熔解曲线	—	—	—

注：熔解曲线程序可根据所使用的 Real Time PCR 扩增仪默认程序进行适配选择。

3）实验结果分析：

反应结束后，对扩增曲线及熔解曲线结果进行分析。详细分析方法参见 Real Time PCR 扩增仪操作手册。

Web: www.sanshibio.com
Email: sanshibio@126.com
Tel : 0311-82970259