

SYBR Green qPCR premix试剂盒说明书

产品概述

本制品是利用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 的试剂盒，是一种 2X premix 型试剂，反应液配制十分简，仅需加入引物、模板及 RNase free water 即可。本制品对 SYBR Green I 浓度、PCR 反应体系都进行了优化，采用了反应性能优越的 Pro Taq HS DNA polymerase 体系，能够有效抑制非特异性产物的扩增，提高 PCR 扩增效率，可以进行高灵敏度的 Real Time PCR 反应，在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，从而对靶基因进行准确定、检测。

产品组成

试剂盒组成	FZ020-100	FZ020-500
2X SYBR Green qPCR Premix ^{*1}	1mL*1	1mL*5
ROX Reference Dye (4 μM)	40μL*1	200μL*1
ROX Reference Dye (20 μM)	40μL*1	200μL*1

*1: 溶液在 -20°C 存放时可能会产生白色或淡黄色的沉淀，使用前可于冰上溶解或手握溶解，颠倒混匀至沉淀全部消失。请勿涡旋振荡。

储存及运输条件

冰袋运输。**避光保存在-20°C**；产品可于 4°C，保存 6 个月。

操作方法

(以 ABI QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR Systems 为例)

1. 配制 RT-qPCR 反应液

组分名称	20μL体系
2X SYBR Green qPCR Premix ^{*1}	10 μL
Primer F (10μM)	0.5 μL ^{*2}
Primer R (10μM)	0.5 μL ^{*2}
ROX Reference Dye (4 μM) ^{*3}	0.4 μL
Template ^{*4}	≤ 100 ng
RNase free water	up to 20 μL

*1: 产品避免反复冻融，防止酶活降低；使用前可上下颠倒混匀，请勿涡旋振荡混匀；产品中含有 SYBR Green，操作过程中注意避光。

*2: 引物推荐使用终浓度为0.25 μM，也可以根据需要在0.2~1.0 μM范围内调整。

*3: 若需要使用ROX进行荧光信号校准，请按照仪器推荐量添加；若不需要，可使用RNase free water代替ROX Reference Dye加入反应体系。

*4: 在 20 μl 体系里，DNA 模板添加量通常在 100 ng 以下，必要时可以进行梯度稀释，以确定合适的模板添加量；如果使用本制品进行 cDNA 的定量PCR 扩增，cDNA 原液使用体积不要超过定量 PCR 反应总体积的 10%。

2. 设置 qPCR 反应程序*1

推荐选择两步法扩增程序*2，具体如下表所示：

qPCR 反应程序（两步法）			
步骤	温度	时间	循环数
1	95 °C	30 sec ^{*3}	1
2	95 °C	5 sec	40
	60 °C	30 sec ^{*4}	
3	熔解曲线		

*1: 请参照仪器操作手册设置反应条件。

*2: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序，如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件；如果引物 Tm 值较低，导致两步法扩增效率较差，可采用三步法进行 PCR 扩增。

*3: 预变性时间通常设定为 30 sec，如果模板变性困难，可以延长预变性时间至 1~2 min。

*4: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下，扩增延伸反应条件设定为 60°C、30 sec 时可以满足要求；如需提高反应特异性，可



适当提高退火温度；如需提高扩增效率，或者 PCR 扩增产物较长，则可将反应延伸时间适当延长，同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。

3. 结果分析

反应结束后，确认熔解曲线及扩增曲线，进行数据分析。

📌 注意事项

1. 合适的模板加入量及浓度

模板量低：导致扩增结果 Ct 值较大，荧光信号值较低，PCR 反应扩增效率较低，反应结果重复性，扩增曲线形状异常。可适当提高模板反应量。

模板量高：导致 Ct 值太小、扩增荧光信号值太高，扩增曲线形状异常； 可适当降低模板量。

模板浓度高：模板取液量体积较小，导致模板加样体积不准， 实验重复性差； 可将模板适当稀释后。

2. 高纯度及完整的模板

模板不纯：含有抑制 PCR 反应的物质，会导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。

模板降解：导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。可重新制备模板，重复试验。

3. 合适的引物浓度

引物浓度低：导致反应效率低，Ct 值较大。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。

引物浓度高：导致反应特异性不好，熔解曲线出现多峰。可适当降低引物浓度。

引物特异性不好：导致反应特异性不好，易形成了引物二聚体，熔解曲线出现多峰。建议重新设计引。

引物完整性不好：可能会导致无扩增曲线，可通过 PAGE 电泳确认引物的完整性，如引物有降解，建议更换引物。

4. 合适的退火温度

退火温度过低：导致反应特异性不好，出现引物二聚体，熔解曲线出现多峰。适当提高退火温度。

退火温度过高：导致扩增效率低无扩增曲线。适当降低退火温度。

5. 如需提高扩增效率，或者 PCR 扩增产物较长，则可将反应延伸时间适当延长，同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。具体程序如下表所示：

qPCR反应程序（三步法）			
步骤	温度	时间	循环数
1	95 °C	30 sec	1
2	95 °C	5 sec	40
	60 °C	10 sec	
	72 °C	30 sec	
3	熔解曲线		

6. 根据下表为仪器选择合适的ROX：

无需添加ROX Reference Dye的qPCR 仪	(Bio-Rad) IQ5, CFX96, CFX384, CFX Connect, MJOpticon, Opticon2; (Cepheid) SmartCycler System, Smart Cyler II System; (Roche) LightCycler 2.0, 480, 96; (Qiagen) Rotor-Gene Q, 3000, 6000; (Bioer) Line-Gene; (Eppendorf) Mastercycler ep realplex; (AnalytikJena) qTOWER3; (TaKaRa) Thermal Cycler Dice™TP700, TP760, TP900, TP960, TP950, TP970, TP980, TP990
需要添加ROX Reference Dye (20μM)的qPCR 仪	(Thermo) ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus
需要添加ROX Reference Dye (4μM)的qPCR 仪	(Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio™3 / 5, QuantStudio™6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™DX; (Agilent) Mx3000P™, Mx3005P™, MX4000™



+86-18911183647



service@d-nano.cn



www.d-nano.cn

