



Version 5

Code No. AG11702

SYBR Green *Pro Taq*

HS 预混型 qPCR 试剂盒 II

SYBR Green Premix

Pro Taq HS qPCR Kit II

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.





➤ 产品概述

本产品是采用 SYBR Green 嵌合荧光法进行 qPCR 的专用试剂，是一种 2X Premix 试剂，反应液配制简便。本产品中 SYBR Green I 浓度、PCR 反应体系都进行了优化，使其特异性强、PCR 扩增效率高，可以进行高灵敏度的 Real Time PCR 反应，可以在宽广的定量区域内得到良好的工作曲线，从而对靶基因进行准确定量检测。

➤ 产品组成

组分名称	AG11702 (500 rxns / 20 μl)
2X SYBR Green Pro Taq HS Premix II	1 ml x 5 pcs

➤ 保存及运输

保存温度：-20°C 保存

(避光保存，长期保存放置在-20°C，产品融化后可于 4°C 保存 1 个月。)

运输温度：干冰运输或-20°C 冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品是一种 2X 预混液，预先混有 SYBR Green I，反应液配制十分简单，仅需加入引物、模板及 RNase free water 即可进行 qPCR 反应。
2. 本产品对 SYBR Green I 浓度及 PCR 反应体系进行了优化，具有扩增效率高、扩增特异性强等特点。

➤ 实验原理

1. PCR 扩增原理

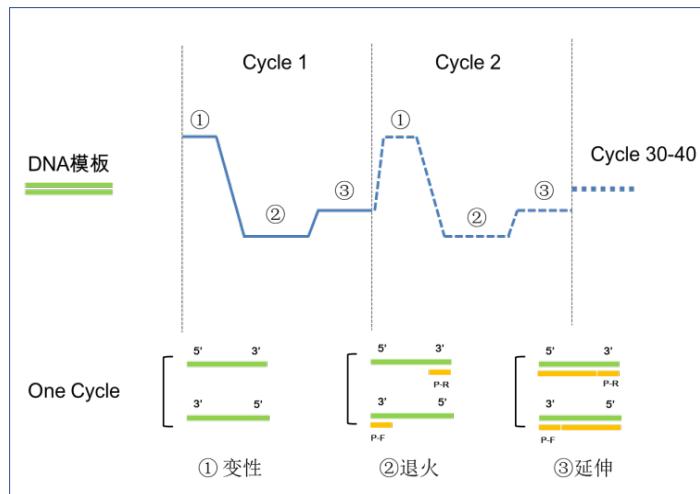
PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

扩增详情如下图：一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30 ~ 40 次。

步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

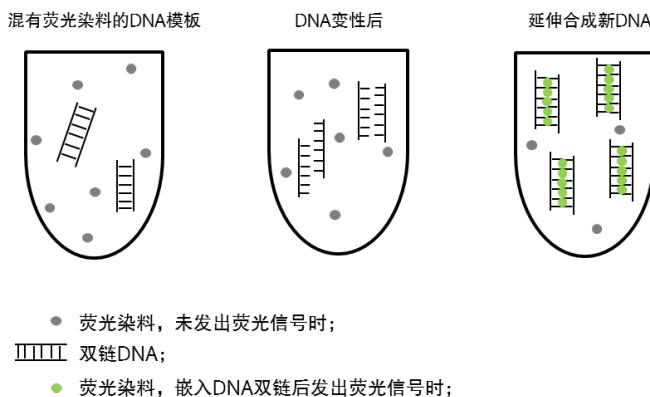
步骤②：引物与单链 DNA 退火；

步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下延伸，与单链 DNA 形成互补链。



2. qPCR 反应原理

SYBR Green I 荧光染料嵌合法利用 SYBR Green I 与双链 DNA 结合后发出荧光的原理，首先将荧光染料 SYBR 加入 PCR 反应液中，在 PCR 扩增的延伸过程中，SYBR Green I 可以嵌合到双链 DNA 双螺旋小沟区域并发出荧光，此时通过检测反应进程中的荧光信号值，达到对靶标基因进行定性/定量分析的目的。



➤ 使用注意事项

- 请仔细阅读所用定量 PCR 仪器设备操作手册，根据仪器操作手册进行操作。
- 本产品中未配有 ROX Reference Dye，如果反应中需要添加 ROX Reference Dye 用以校正孔间荧光信号值误差，可选择如下产品配合使用：（请根据仪器设备说明书要求确定是否需要添加 ROX Reference Dye）

ROX Reference Dye (20 μM) (AG11703)

ROX Reference Dye (4 μM) (AG11710)



注：上述 ROX Reference Dye 产品建议 50X 稀释使用（例如，50 μl 反应体系中添加 1 μl ROX Reference Dye），如果实验结果不理想，可调整 ROX Reference Dye 添加量。

- 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，防止酶活降低，同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。
- 产品中含有 SYBR Green I，因此溶液操作过程中要注意避免强光照射。
- 产品-20°C存放可能会产生淡黄色或白色沉淀，使用前可于冰上溶解或手握放置，颠倒混匀至沉淀全部消失。请勿使用涡旋振荡。

➤ 实验前准备

1) 试剂 & 耗材：

Primer、DNA 模板、RNase free water 、定量 PCR tube、带滤芯枪头。

2) 仪器：

	仪器
无需添加	(Bio-Rad) IQ5, CFX96™, CFX384™, CFX Connect™, MJOpticon, Opticon 2; (Cepheid) SmartCycler® System, Smart Cycler II System; (Roche) LightCycler® 2.0, 480, 96; (Qiagen) Rotor-Gene® Q, 3000, 6000; (Bioer) Line-Gene; (Eppendorf) Mastercycler ep realplex; (Analytik Jena) qTOWER3.
添加 AG11703 (终浓度为 0.4 μM)	(Thermo) ABI7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus.
添加 AG11710 (终浓度为 0.08 μM)	(Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™ 7, QuantStudio™ 3 / 5, QuantStudio™ 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™ Dx; (Agilent) Mx3000P™, Mx3005P™, MX4000™.



➤ 操作方法

(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System 为例)

1) 配制 PCR 反应液

组分名称	20 μl 体系	50 μl 体系
2X SYBR Green Pro Taq HS Premix II	10 μl	25 μl
Template ^{*1}	≤100 ng	≤200 ng
Primer F (10 μM) ^{*2}	0.8 μl	2 μl
Primer R (10 μM) ^{*2}	0.8 μl	2 μl
ROX Reference Dye (4 μM) ^{*3, *4}	0.4 μl	1 μl
RNase free water	up to 20 μl	up to 50 μl

*1: 在 20 μl 体系里, DNA 模板添加量通常不高于 100 ng; 在 50 μl 体系里, DNA 模板添加量通常不高于 200 ng。必要时可以将模板 DNA 进行稀释, 以确定合适的模板添加量。如果使用本产品进行 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: 引物通常使用终浓度为 0.4 μM, 可根据实际情况在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整。

*3: 请按照不同仪器推荐的反应体系配制反应液。如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准, 请按照仪器推荐量添加。

*4: 若不需要使用 ROX 的 PCR 仪, ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。

2) qPCR 反应条件

两步法 PCR 反应程序^{*1}:

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec ^{*2}	1
变性	95°C	5 sec	40
退火和延伸 ^{*4}	60°C ^{*3}	30 sec ^{*3}	
熔解曲线采集 ^{*5}	95°C	15 sec	1
	60°C	1 min	
	95°C	1 sec	

*1: 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 (三步法 PCR 反应程序可参考附录)。

*2: 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。

*3: 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。

*4: 此步骤进行荧光信号值采集。

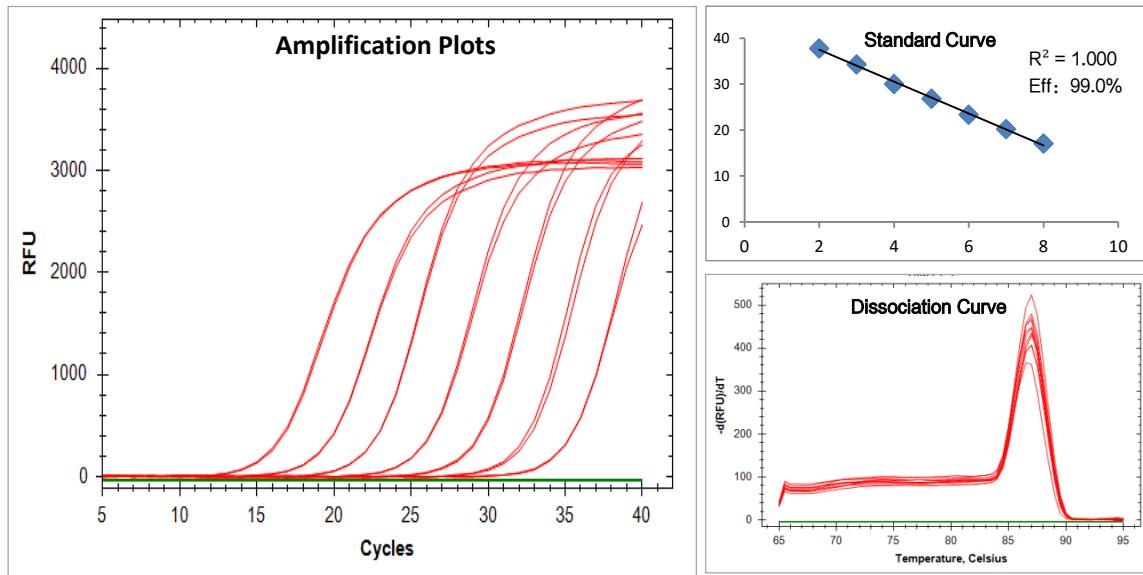
*5: 此步为必须步骤，此熔解曲线为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems Standard 模式下默认程序。不同仪器的熔解曲线采集程序不同，选用仪器对应的默认程序即可。

➤ 结果检测

反应结束后，确认扩增曲线和熔解曲线，并进行标准曲线分析。
(分析方法请参照仪器操作手册)

➤ 实验例

1. 使用本产品进行两步法荧光定量 RT-qPCR 检测 Human β Actin 基因，模板 cDNA 添加量（相当于 Total RNA 量）为 100 ng ~ 0.1 pg。cDNA 的合成使用本公司的 *Evo M-MLV* 反转录试剂预混液(用于 qPCR) (Code No. AG11706)。结果如下：

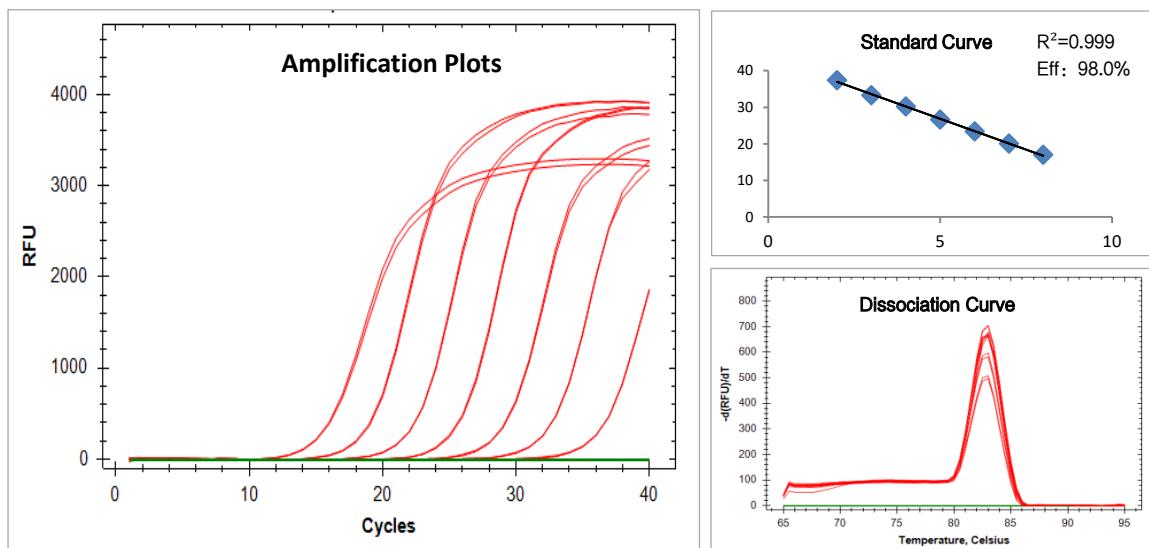


结果如上图：1、工作曲线 $R^2=1.000$ ，扩增效率 99.0%。

- 2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量，100 ng ~ 0.1 pg cDNA 浓度（相当于 Total RNA 量）范围内扩增曲线呈现良好的线性关系。
- 3、熔解曲线峰型单一、无杂峰，扩增特异性强。



2. 使用本产品进行两步法荧光定量 RT-qPCR 检测 Mouse *malat1* 基因，模板 cDNA 添加量（相当于 Total RNA 量）为 100 ng ~ 0.1 pg。cDNA 的合成使用本公司的 *Evo M-MLV* 反转录试剂预混液(用于 qPCR) (Code No. AG11706)。结果如下：



结果如上图：1、工作曲线 $R^2=0.999$ ，扩增效率 98.0%。

- 2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量，100 ng ~ 0.1 pg cDNA 浓度（相当于 Total RNA 量）范围内扩增曲线呈现良好的线性关系。
- 3、熔解曲线峰型单一、无杂峰，扩增特异性强。

➤ 产品注意事项

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，反应结果重复性较差，扩增曲线形状异常。可适当提高模板量。
- ❖ 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加样。

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。可对模板重新提纯。针对 cDNA 的定量反应中，熔解曲线出现多峰，可能是 RNA 模板中混有基因组 DNA，导致反应特异性不好。可先使用本公司的 *Evo M-MLV* 反转录预混型试剂盒（含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR）Ver.2 (Code No. AG11728) 去除模板中的基因组 DNA。



- ❖ 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，重复实验。

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。建议重新设计引物。
- ❖ 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。
- ❖ 引物设计的原则：
 - ① 引物一般是 15 ~ 30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40 ~ 60% 之间。
 - ② 建议正反向引物 Tm 值在 50 ~ 70°C，两引物 Tm 值相差不超过 5°C。
 - ③ 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
 - ④ 引物 3' 端避免出现发夹结构。
 - ⑤ 减少引物之间的互补序列，最好不要超过 4 个碱基连续互补序列。

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. 实验细节

- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡。
- ❖ 本产品-20°C 存放可能会产生淡黄色或白色沉淀，使用前确保完全融化并混匀。
- ❖ 确认 ROX 与仪器是否匹配，ROX 使用前确保完全融化并混匀。
- ❖ 检查反应程序，确保反应程序设置正确。



➤ 附录：三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	5 sec	40
退火	55°C	30 sec	
延伸 ^{*1}	72°C	30 sec	
熔解曲线采集 ^{*2}	95°C	15 sec	1
	60°C	1 min	
	95°C	1 sec	

*1：此步骤进行荧光信号值采集。

*2：此步为必须步骤，此熔解曲线为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems Standard 模式下默认程序。不同仪器的熔解曲线采集程序不同，选用仪器对应的默认程序即可。