



# Real Time PCR Easy™-SYBR Green I

Cat.No.QP-01011/01012/01013/01014

For qPCR using cDNA,purified DNA

For research use only

Store at -20°C



## 目 录

产品介绍	3
产品特点	3
试剂盒应用	3
产品质量控制	3
试剂盒内容	4
储存条件	4
试剂盒组分信息	4
注意事项	5
试剂盒原理	5
操作前准备事项	6
实验材料和设备	6
安全性	6
操作指南	7
● Real Time PCR Easy™-SYBR Green I 操作步骤	7
Real Time PCR 引物设计原则	9
● Forward Primer 和 Reverse Primer	9
● Probe	9
操作示意图	11
问题分析指南	12

## 产品介绍

Real Time PCR Easy™-SYBR Green I试剂盒提供的2× Real PCR Easy™ Mix-SYBR是一种使用SYBR Green I进行Real Time PCR扩增反应的全新预混系统，能大幅度提高产物特异性和反应灵敏度。同时，提供ROX作为内参染料。该试剂盒的荧光强度为同类产品的3-5倍，能更灵敏的、更直观的反应目的模板DNA的浓度。

2× Real PCR Easy™ Mix-SYBR包含本公司特有的热启动Foregene Taq DNA Polymerase，该酶相对于普通Taq酶具有扩增效率高、特异性扩增能力强、错配率低等优点。用于荧光定量PCR反应可减少非特异性扩增，提高PCR的准确性。

## 产品特点

- ◆ 独特的PCR优化体系，使2× Real PCR Easy™ Mix-SYBR具有更强的兼容性。
- ◆ 热启动Foregene Taq Polymerase，具有更高的扩增效率、更高的扩增灵敏度、更高的扩增特异性。
- ◆ 优化的2× Real PCR Easy™ Mix使SYBR Green I具有更高的检测灵敏性，其荧光强度为同类产品的3-5倍，可满足不同类型的荧光定量实验需求。
- ◆ 本产品附带有ROX内参染料，可用于消除信号本底及孔间信号误差，方便客户用于不同型号定量PCR仪使用。

## 试剂盒应用

荧光定量 PCR 进行模板定量分析/常规 PCR 扩增。

## 产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System)，每一批次的 Real Time PCR Easy™-SYBR Green I 都严格进行多次测试，确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

## 试剂盒内容

Real Time PCR Easy™-SYBR Green I (20µl 体系)				
试剂盒组成	QP-01011	QP-01012	QP-01013	QP-01014
	200 Preps	500 Preps	1000 Preps	2000 Preps
2× Real PCR Easy™ Mix-SYBR	1ml×2	1.7ml×3	1.7ml×6	1.7ml×12
50× ROX Reference Dye	400µl	1ml	1ml×2	1ml×4
DNase-Free ddH <sub>2</sub> O	1.7ml	1.7ml×2	10ml	20ml
说明书	1 份	1 份	1 份	1 份

## 储存条件

### 1. 运输条件

- ❖ 全程低温冰盒运输，保证试剂盒处于<4°C状态。

### 2. 保存条件

- ❖ 本试剂盒避光保存于-20°C；若频繁使用，也可置于 4°C短期保存(限 10 天内用完)。
- ❖ 2× Real Time PCR Easy™ Mix-SYBR 和 ROX Reference Dye 需避光保存于-20°C；若频繁使用，也可置于 4°C短期保存(限 10 天内用完)。

## 试剂盒组分信息

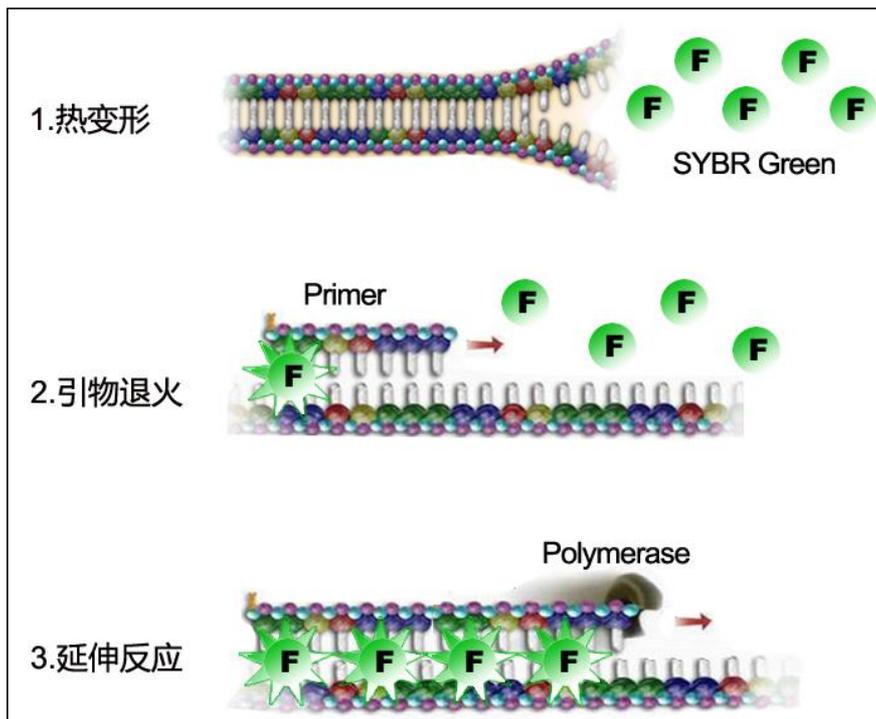
- ◆ 2× Real PCR Easy™ Mix-SYBR：包含福际生物特别改造的热启动 Taq DNA Polymerase、MgCl<sub>2</sub>、优化配比的 dNTPs 和 SYBR Green I、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂等。PCR 反应时，只需将适当的裂解混合液、引物、DNase-ddH<sub>2</sub>O 添加到 2× Real PCR Easy™ Mix-SYBR 中即可用于 PCR 反应。
- ◆ ROX Reference Dye：一般用于 ABI、Stratagene 等公司的 Real Time PCR 扩增仪上，用于调整 PCR 加样误差所引起的 PCR 管与管之间的差异。不同仪器所需 ROX Reference Dye 浓度不同，用户可以根据仪器的推荐浓度添加。
- ◆ DNase-Free ddH<sub>2</sub>O：超纯水，用于 PCR 反应。

## 注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 2× Real PCR Easy™ Mix-SYBR 置于-20℃ 保存，应避免反复冻融，否则会影响 PCR 效率。
- ◆ 使用时请将 2× Real PCR Easy™ Mix-SYBR 上下颠倒轻柔混匀，避免起泡，并瞬时离心后使用。如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。切勿使用振荡器混匀。
- ◆ 2× Real PCR Easy™ Mix-SYBR 含有 SYBR Green I，保存时或配制 PCR 反应液时应避免强光照射。
- ◆ 反应液的配制、分装请一定使用新的(无污染的)枪头、PCR 管等，尽量避免污染。

## 试剂盒原理

试剂盒使用了热启动 Foregene Taq DNA Polymerase 进行 PCR 扩增，通过检测反应液中 SYBR Green I 的荧光强度，达到监控 PCR 产物扩增量的目的。在 PCR 反应体系中，加入过量 SYBR Green I 荧光染料，SYBR Green I 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后，发射荧光信号，而不掺入链中的 SYBR Green I 染料分子不会发射任何荧光信号，从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。SYBR Green I 与双链 DNA 结合后发出荧光，可以通过检测反应体系中的 SYBR Green I 荧光强度，达到检测 PCR 产物扩增量的目的。



## 操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。Real Time PCR Easy™-SYBR Green I 操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

## 实验材料和设备

- ◆ 0.2ml 无菌 PCR 管。
- ◆ 荧光定量 PCR 扩增仪、微量移液器、冰浴。
- ◆ 自备 DNA 模板、PCR 引物。

## 安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医学、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。

## 操作指南

### A: Real Time PCR 体系配制

- 取出 2× Real PCR Easy™ Mix-SYBR、50× ROX Reference Dye、引物等置于冰盒中，使其自然融化。融化后，上下颠倒混匀试剂，可用离心机瞬时离心收集散落在管壁和盖子上的液体。

注意：2× Real PCR Easy™ Mix-SYBR 放在室温或握在手中时间较长会变浑浊，可将其置于冰上 2-5min，待溶液澄清，上下颠倒混匀 3-5 次后再使用。

- 将适量的 DNA 模板、引物或 50× ROX Reference Dye 添加到 2× Real PCR Easy™ Mix-SYBR 中，并用 DNase-Free ddH<sub>2</sub>O 使其稀释为 1×(PCR 体系配制见下表 1)。

注意：该操作应在冰浴上进行，长时间的室温放置会降低产品性能。

**表 1: PCR 反应体系配制**

PCR 体系添加内容	用 量	终 浓 度
2× Real PCR Easy™ Mix-SYBR	10μl	1×
Forward Primer (10μM)	0.8μl	0.4μM <sup>1*</sup>
Reverse Primer (10μM)	0.8μl	0.4μM <sup>1*</sup>
Template(DNA)	Xμl	2*
50× ROX Reference Dye	-	3*
DNase-Free ddH <sub>2</sub> O	(8.4-X)μl	
Total Volume	20μl	

注意：50μl 体系的 qPCR，请参照 20μl 体系按比例调整试剂用量。

1\*：通常引物终浓度为 0.4μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.2~1.0μM 范围内调整引物浓度。

2\*：DNA 模板的添加量通常在 100ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的 DNA 模板添加量。

3\*：根据定量 PCR 仪器不同选择合适终浓度的 ROX Reference Dye。常见定量 PCR 仪的最适 ROX Reference Dye 浓度见下表：

荧光定量 PCR 仪	ROX Reference Dye 终浓度
ABI PRISM7000/7300/7700/7900HT/Step One 等	5× (如 20μl 体系，加入 2μl 50×ROX Reference Dye)
ABI 7500/7500 Fast 和 Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000 等	1× (如 20μl 体系，加入 0.4μl 50×ROX Reference Dye)

**B: Real Time PCR 反应**

根据 A 步骤配制好 PCR 体系，混匀，根据优化好的 PCR 条件(退火温度等)进行 PCR 反应(两步法反应条件见下表 2-1，三步法反应条件见下表 2-2)。

**表 2-1: 两步法**

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	94-95°C	3min	1	预变性
2(两步)	94-95°C	5-10sec	40	循环中模板变性
	60-65°C	20-30sec		退火/延伸

**表 2-2: 三步法**

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	94-95°C	3min	1	预变性
2(三步)	94-95°C	5-10sec	40	循环中模板变性
	55-65°C	10sec		退火
	72°C	20sec		延伸

注意：为了得到最佳的PCR效果，针对不同的模板、不同的引物可采用梯度PCR优化反应条件。

PCR反应条件视定量PCR仪、模板、引物等的不同而各异。在具体操作中需要根据定量PCR仪、模板类型、目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的GC含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，反应时间等。

## Real Time PCR 引物设计原则

### Forward Primer和Reverse Primer

进行Real Time PCR，引物设计非常重要。引物关系到PCR扩增的特异性、高效性等，可以参照以下原则进行引物设计：

- ◆ 引物长度：18-30bp。
- ◆ GC含量：40-60%。
- ◆ Tm值：引物设计软件，如Primer 5，可以给出引物的Tm值。上下游引物的Tm值应尽量接近。也可以使用Tm计算公式： $Tm=4^{\circ}C(G+C)+2^{\circ}C(A+T)$ 。进行PCR时，一般选择低于引物Tm值5°C的温度作为退火温度（相应的提高退火温度可以增加PCR反应的特异性）。
- ◆ 引物及PCR产物：
  - ❖ 设计引物PCR扩增产物长度最好在100-150bp。
  - ❖ 应尽量避免在模板的二级结构区域设计引物。
  - ❖ 避免上下游引物3'端之间形成2个或2个以上的互补碱基。
  - ❖ 引物3'端碱基不能存在多余3个连续的G或C。
  - ❖ 引物自身不能存在互补结构，否则会形成发夹结构，影响PCR扩增。
  - ❖ 引物序列中ATCG应尽量分布均匀，3'端碱基避免为T。

### Probe

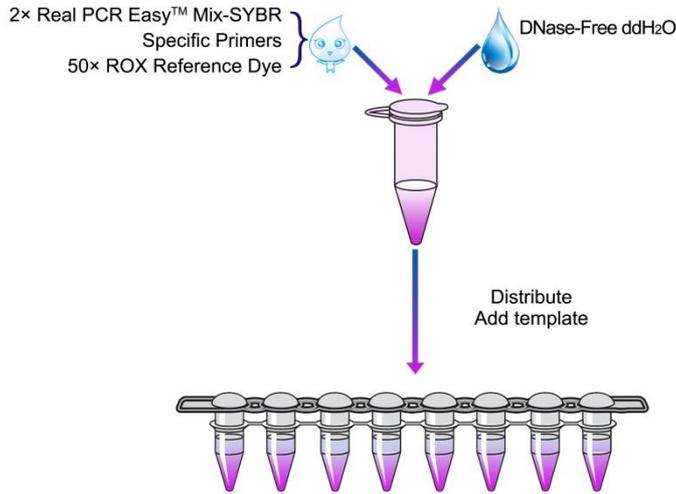
探针选择要保守，引物选择要保守，因此必须找一段100-200bp相对要保守的片段来设计引物与探针。即real-time PCR的扩增片段是50bp-150bp。当找不到150bp的保守片段时，必须确保探针的片段是保守的。一般按照以下原则进行Probe的设计：

- ◆ 探针位置尽可能地靠近上游引物。
- ◆ 探针长度应在15-45bp(最好是20-30bp)，以保证结合特异性。
- ◆ 检测探针的DNA折叠和二级结构。
- ◆ Tm值在65-70°C，通常比引物TM值高5-10°C(至少要5°C)，GC含量在40%-70%。

- ◆ 探针的5'端应避免使用G鸟嘌呤——因为5'G会有淬灭作用，而且即使是被切割下来还会存在淬灭作用。
- ◆ 整条探针中，碱基C的含量要明显高于G的含量——G含量高会降低反应效率，这时就应选择配对的另一条链作为探针。
- ◆ 为确保引物探针的特异性，最好将设计好的序列在blast中核实一次，如果发现非特异性互补区，建议重新设计引物探针。

# 操作示意图

## SYBR Green染料法



SYBR Green染料法qPCR 反应体系	
组分	体积
(for 20μl PCR reaction)	
2x Seed PCR Easy™ Mix-SYBR	10μl
Specific Primers	1.6μl
Template	Xμl
50x ROX Reference Dye	-
DNase-Free ddH <sub>2</sub> O	(8.4-X)μl



qPCR结果分析

qPCR 反应条件(两步法)			
Step	Temp	Time	Cycles
1	94°C	3min	1
2	94°C	5-10sec	} 40
3	60-65°C	20-30sec	

qPCR 反应条件(三步法)			
Step	Temp	Time	Cycles
1	94°C	3min	1
2	94°C	5-10sec	} 40
3	55-65°C	10sec	
4	72°C	20sec	

## 问题分析指南

以下针对 Real PCR Easy™ 系列试剂盒在实验中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-83360257 或 E-mail: Tech@foregene.com。

### 无扩增信号

1. 试剂盒保存不当导致SYBR失效或者试剂盒过期导致SYBR荧光信号丢失。  
建议：试剂盒打开后，其中的试剂要避光-20℃保存，且不能经常冻融；购买新的 Real Time PCR Kit试剂盒进行相关实验。
2. 试剂盒中的Taq DNA Polymerase因试剂盒保存不当或过期而失去活性。  
建议：确认试剂盒的保存条件；重新在PCR体系中添加适量Taq DNA Polymerase 或者购买新的Real Time PCR Kit试剂盒进行相关实验。
3. DNA模板中存在大量的Taq DNA Polymerase的抑制因子。  
建议：重新纯化模板或降低模板的使用量。
4. Mg<sup>2+</sup>浓度不适合。  
建议：我们提供的2× Real PCR Mix的Mg<sup>2+</sup>浓度为3.5 mM。但针对有些特殊的引物和模板可能需要的Mg<sup>2+</sup>浓度较高，因此可直接添加MgCl<sub>2</sub>进行Mg<sup>2+</sup>浓度的优化，建议每次增加0.5mM的Mg<sup>2+</sup>进行优化。
5. PCR扩增条件不适合、引物序列或者浓度不当。  
建议：确认引物序列的正确性以及引物没有降解；扩增信号不好时，可尝试降低退火温度，适当调整引物浓度等。
6. 模板用量问题，太少或过多。  
建议：可进行模板线性化梯度稀释，选择PCR效果最好的模板浓度进行Real Time PCR实验。

### NTC 出现过高的荧光值

1. 在操作过程中导致的试剂污染。  
建议：更换新的试剂进行Real Time PCR实验。
2. PCR反应体系配制时发生污染。  
建议：操作时进行必要的防护措施，比如：戴乳胶手套，使用带滤芯的枪头等。
3. 引物出现降解，引物降解会导致非特异性扩增出现。

建议：可使用SDS-PAGE电泳检测引物是否降解，更换新的引物进行Real Time PCR实验。

## 出现引物二聚体或非特异性扩增

### 1. Mg<sup>2+</sup>浓度不适合。

建议：我们提供的2× Real PCR Easy™ Mix的Mg<sup>2+</sup>浓度为3.5 mM。但针对有些特殊的引物和模板可能需要的Mg<sup>2+</sup>浓度较高，因此可直接添加MgCl<sub>2</sub>进行Mg<sup>2+</sup>浓度的优化，建议每次增加0.5mM的Mg<sup>2+</sup>进行优化。

### 2. PCR退火温度过低。

建议：每次增加1°C或者2°C进行PCR退火温度的优化。

### 3. PCR产物太长。

建议：Real Time PCR产物长度最好在100-150bp之间，不要超过500bp。

### 4. 引物出现降解，引物降解会导致很会飞特异性扩增出现。

建议：可使用SDS-PAGE电泳检测引物是否降解，更换新的引物进行Real Time PCR实验。

### 5. PCR体系不当，或体系太小。

建议：PCR反应体系太小会导致检测精度降低。最好使用定量PCR仪推荐的反应体系重新进行Real Time PCR实验。

## 定量值重复性差

### 1. 仪器故障。

建议：仪器的每一个PCR孔之间可能存在误差，在温度管理或检测时产生重现性较差现象。请根据相应仪器的说明书进行点检。

### 2. 样品纯度不好。

建议：样品不纯会导致实验的重复性较差，这包括模板、引物的纯度。最好进行模板的再纯化，引物最好使用SDS-PAGE纯化。

### 3. PCR体系配制放置时间过长。

建议：Real Time PCR体系配制好后立即用于PCR实验，不要搁置太长时间。

### 4. PCR扩增条件不适合、引物序列或者浓度不当。

建议：确认引物序列的正确性以及引物没有降解；扩增信号不好时，可尝试降低退火温度，适当调整引物浓度等。

### 5. PCR体系不当，或体系太小。

建议：PCR反应体系太小会导致检测精度降低。最好使用定量PCR仪推荐的反应体系重新进行Real Time PCR实验。

中国 ● 福际      World's Foregene

成都福际生物技术有限公司

电话: 028-83360257, 028-83361257

E-mail: [info@foregene.com](mailto:info@foregene.com)

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

