

For research use only

Version Number: 1.0

ForeColor-(Blue) Real Time PCR Easy™-SYBR Green I

For real time PCR using cDNA, purified DNA

试剂盒组成 (20 μL 体系)	QP-03011	QP-03012
	500 T	2000 T
2× Blue Real PCR Easy™ Mix-SYBR	1.7 mL × 3	1.7 mL × 12
50× ROX Reference Dye	1 mL	1 mL × 4
DNase-Free ddH ₂ O	5 mL	20 mL
说明书	1 份	1 份

产品简介

试剂盒提供的 2× Blue 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× Blue Real PCR Easy™ Mix-SYBR 包含抗体法修饰的热启动酶 Foreasy HS 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；同时还包含蓝色指示剂，便于移液示踪，有效减少移液错误。

运输及储存条件

1. 运输条件：全程低温冰盒运输。
2. 保存条件：避光保存于-20℃；若频繁使用，也可置于 4℃短期保存(限 10 天内用完)。

试剂盒组分信息

- ❖ 2× Blue Real PCR Easy™ Mix-SYBR：包含抗体修饰的热启动酶 Foreasy HS Taq DNA Polymerase、MgCl₂、优化配比的 dNTPs 和 SYBR Green I、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂、稳定剂以及指示剂等。PCR 反应时，只需将适当的模板、引物、DNase-ddH₂O 添加到 2× Blue 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。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 2× Blue 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× Blue 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× Blue Real PCR Easy™ Mix-SYBR (含有 SYBR Green I) 和 50× ROX Reference Dye，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。

操作指南

A: Real Time PCR 体系配制

1. 取出 2× Blue Real PCR Easy™ Mix-SYBR、50× ROX Reference Dye (按需)、引物等，使其自然解冻。解冻后，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。
2. 将适量的 DNA 模板、引物或 50× ROX Reference Dye 添加到 2× Blue Real PCR Easy™ Mix-SYBR 中，并用 DNase-Free ddH₂O 使其稀释为 1×(PCR 体系配制示例见表 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 反应体系配制示例

PCR 体系添加内容	用 量	终 浓 度
2× Blue Real PCR Easy™ Mix-SYBR	10 µL	1×
Forward Primer (10 µM)	0.5 µL	0.2-1.0 µM ^{1*}
Reverse Primer (10 µM)	0.5 µL	0.2-1.0 µM ^{1*}
Template (cDNA/DNA)	X µL	2*
50× ROX Reference Dye	-	3*
DNase-Free ddH ₂ O	(9-X) µL	
Total Volume	20 µL	

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

1*: 通常引物终浓度为 0.25 µM 可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在 0.2-1.0 µM 范围内调整引物浓度。

2*: DNA 模板的添加量通常在 100 ng 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 20 µL 体系, 加入 2 µL 50×ROX Reference Dye)
ABI 7500/7500 Fast 和 Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000 等	1× (如 20 µL 体系, 加入 0.4 µL 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(两步法反应条件示例见表 2-1, 三步法反应条件示例见表 2-2)。

表 2-1: 两步法示例

步 骤	温 度	时 间	循 环 数	内 容
1	94-95°C	3 min	1	预变性
2(两步)	94-95°C	5-10 sec	40	循环中模板变性
	60-65°C	20-30 sec		退火/延伸

表 2-2: 三步法示例

步 骤	温 度	时 间	循 环 数	内 容
1	94-95°C	3 min	1	预变性
2(三步)	94-95°C	5-10 sec	40	循环中模板变性
	55-65°C	10 sec		退火
	72°C	20 sec		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。