

2X living SYBR Premix EsTaq plus (with Tli RNaseH) (改良荧光定量PCR试剂盒) 使用说明书

产品名称	单位	货号
2X livingSYBR Premix EsTaq plus (with Tli RNaseH)	50 μ l 反应 \times 40 次	FM788S
2X livingSYBR Premix EsTaq plus (with Tli RNaseH)	50 μ l 反应 \times 200 次	FM788M
2X livingSYBR Premix EsTaq plus (with Tli RNaseH)	50 μ l 反应 \times 400 次	FM788L

【储存条件】

长期保存, 请置于 -20°C , 有效期 24 个月。经常使用, 可置于 4°C 保存至少六个月。

【产品简介】

本产品采用 Sybrgreen 嵌合荧光法进行荧光定量的专用试剂。制品中含有荧光定量反应的最适浓度 Sybrgreen, 是一种 $2\times$ 浓度的预混试剂, 进行实验时, PCR 反应液的配制十分方便简单。制品中使用了 antiTaq 抗体的 Hot Start 法用 DNA 聚合酶, 与荧光定量反应适合 Buffer 组合, 可以有效抑制非特异性的 PCR 扩增, 大大提高 PCR 的扩增效率, 可以进行高灵敏度的荧光定量扩增反应。

本产品 Buffer 经过改良, 使反应特异性比 SybrGreenPremix Ex Taq (withTli RNaseH) (货号 MF787) 更高。

另外, 本产品中添加了 Tli RNaseH (耐热性 RNaseH), 以 cDNA 作为模板进行 PCR 反应时, 可以很好地抑制由于 cDNA 中残存 mRNA 对 PCR 反应造成的阻害作用。适合于快速荧光定量扩增反应, 可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线, 对靶基因进行准确定量、检测, 重复性好, 可信度高。

【产品组份】

	FM788S	FM788M
2x livingSYBR Premix EsTaq plus (withTli RNaseH) *	1.0 ml	5x1ml
ROX Reference Dye (50 \times) **	40 μ l	200 μ l
ROX Reference Dye II (50 \times) **	40 μ l	200 μ l

*由以下组分预混而成: EsTaq plus, dNTP Mixture, Mg^{2+} , Tli RNaseH, Sybrgreen。

** ROX Reference Dye 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。例如使用 Applied Biosystems 的 Real Time PCR 扩增仪进行实验就需要校正。

- ◆ 需要使用 ROX Reference Dye 校正的仪器 Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- ◆ 需要使用 ROX Reference Dye II 校正的仪器 Applied Biosystems 7500 和 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- ◆ 不需要校正的仪器 Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990) Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (Code No. TP700/TP760) Smart Cycler II System(Cepheid) LightCycler/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics) CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

【使用注意】

1. 使用前, 请上下轻轻颠倒混匀, 避免产生气泡, 防止因混合不均匀造成的反应效果不佳。但请勿涡旋振荡混匀。
2. Sybrgreen Premix EsTaq plus 在 -20°C 存放可能会产生白色或淡黄色的沉淀, 可用手握缓慢溶解, 于室温短时间避光放置, 轻柔上下颠倒混匀直至沉淀全部消失。沉淀会导致溶液成分不均匀, 使用前务必充分混匀试剂。
3. 配制反应液时, 试剂请于冰上放置。反应液的配制、分装请一定使用新的 (无污染) 的枪头、Microtube 等, 尽量避免污染。
4. 本制品中含有荧光染料 Sybrgreen, 配制 PCR 反应液时应避免强光照射。

【所需试剂】

本产品为 2×预混荧光定量 PCR 反应体系，使用时只需加入模板、引物和水，使其工作浓度为 1×,即可进行反应。具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点，可最大限度地减少人为误差、节约 PCR 实验操作时间、降低污染几率。

【操作示例】

注意：请严格按照不同仪器的操作手册进行实验。

一、以 Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR System 的操作方法为例

1、按下表配制 PCR 反应体系：

组分名称	50ul 体系	20ul 体系
Template DNA***	4 μl	2μl
2x livningSYBR Premix EsTaq plus (withTli RNaseH)	25 μl	10μl
Primer 1 (10μM)*	1 μl	0.4μl
Primer 2 (10μM)*	1 μl	0.4μl
ROX Reference Dye (50x) or ROX Reference Dye II (50x)**	1 μl	0.4μl
ddH ₂ O	18 μl	6.8μl
	50 μl	20ul

*通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μM 范围内调整引物浓度。

**ROX Reference Dye II(50x)比 ROX Reference Dye(50x)浓度低，使用 7500 /7500 Fast Real-Time PCR System 时，请使用 ROX Reference Dye II(50x)。使用 ABI PRISM 7300 Real-Time PCR System 和 StepOnePlus 时，请使用 ROX Reference Dye(50×)。

*** 20 μl 反应体系中，DNA 模板的添加量要在 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，必要时需要进行梯度稀释，以确定合适的 DNA 模板添加量。

如果欲使用本产品进行 Two-Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2、进行 荧光定量 PCR 反应

< Applied Biosystems 7300/7500 和 StepOnePlus Real-Time PCR System >

两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性 循环数：1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应 循环数：40

95°C 5 秒

60°C 30~34 秒*

Dissociation stage *

使用 StepOnePlus 时请设定 在 30 秒。

使用 7300 时请设定在 31 秒。

使用 7500 时请设定在 34 秒。

<Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System>

两步法 PCR 扩增标准程序:

Stage 1: 预变性 循环数: 1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应 循环数: 40

95°C 3 秒

60°C 30 秒

Stage 3: Melt Curve

注意:

- 1) 本产品是利用 anti-Taq 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶, 与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比, 不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长, 会使酶的活性下降, 其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性, 通常设定为 95°C、30 秒。
- 2) 如果以上两步法程序得不到良好的实验结果时, 请再进行 PCR 条件的优化。由于使用 T_m 值较低的引物等原因, 两步法 PCR 反应扩增性能较差时, 可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

3、标准曲线制作和结果分析

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线, 进行 PCR 定量时制作标准曲线等。
分析方法参见仪器的操作手册。

二、以 LightCycler/LightCycler480 System 的操作方法为例

1、按下表配制 PCR 反应体系:

组分名称	20ul 体系
Template DNA**	2μl
2x livningSYBR Premix EsTaq plus (withTli RNaseH)	10μl
Primer 1 (10μM)*	0.4μl
Primer 2 (10μM)*	0.4μl
ddH ₂ O	7.2μl
	20ul

*通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在 0.1~1.0 μM 范围内调整引物浓度。

** 20 μl 反应体系中, DNA 模板的添加量要在 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, 必要时需要进行梯度稀释, 以确定合适的 DNA 模板添加量。

如果欲使用本产品进行 Two-Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应, 第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2、进行 荧光定量 PCR 反应

PCR 反应用毛细管请用离心机轻轻离心后放入 LightCycler 中进行荧光定量 PCR 反应。建议采用下列显示的两步法 PCR 反应程序, 如果该程序得不到良好的实验结果时, 再进行 PCR 条件的优化。由于使用 T_m 值较低的引物等原因, 两步法 PCR 反应扩增性能较差时, 可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

< LightCycler > 两步法 PCR 扩增标准程序:

Stage 1: 预变性 循环数: 1

95°C 30 秒 20°C/秒

Stage 2: PCR 反应 循环数: 40

95°C 5 秒 20°C/秒

60°C 20 秒 20°C/秒

Stage 3: 融解曲线分析95°C

0 秒 20°C/秒

65°C 15 秒 20°C/秒

95°C 0 秒 0.1°C/秒

< LightCycler 480 System > 两步法 PCR 扩增标准程序:

变性

95°C 30 秒 (Ramp rate: 4.4°C/秒) 1
cycle

PCR

分析模式: 定量分析

95°C 5 秒 (Ramp rate: 4.4°C/秒)

60°C 30 秒. (Ramp rate: 2.2°C/秒, Acquisition Mode : Single) 40
cycles

融解

分析模式: 融解曲线

95°C 5 秒 (Ramp rate: 4.4°C/秒) 60°C

1 分钟 (Ramp rate: 2.2°C/秒)

95°C (Ramp rate: 0.11°C/秒, Acquisition Mode : Continuous, Acquisitions : 5 per°C) 1 cycle

降温

50°C 30 秒 (Ramp rate: 2.2°C/秒) 1
cycle

注意:

本产品是利用 anti-Taq 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶, 与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比, 不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长, 会使酶的活性下降, 其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性, 通常设定为 95°C、30 秒。

3、标准曲线制作和结果分析

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线, 进行 PCR 定量时制作标准曲线等。分析方法参见仪器的操作手册。

三、以 Smart Cycler II System 的操作方法为例

1、按下表配制 PCR 反应体系:

组分名称	20ul 体系
Template DNA**	2 μ l
2x livningSYBR Premix EsTaq plus (withTli RNaseH)	12.5 μ l
Primer 1 (10 μ M)*	0.5 μ l
Primer 2 (10 μ M)*	0.5 μ l
ddH ₂ O	9.5 μ l
	25ul

*通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时,可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

** 20 μ l 反应体系中, DNA 模板的添加量要在 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,必要时需要进行梯度稀释,以确定合适的 DNA 模板添加量。

如果欲使用本产品进行 Two-Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应, 第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2、进行 荧光定量 PCR 反应

PCR 反应管请用离心机轻轻离心后放入 Smart Cycler 中进行荧光定量 PCR 反应。建议采用下列显示的两步法 PCR 反应程序, 如果该程序得不到良好的实验结果时, 再进行 PCR 条件的优化。由于使用 T_m 值较低的引物等原因, 两步法 PCR 反应扩增性能较差时, 可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

两步法 PCR 扩增标准程序:

Stage 1: 预变性

Hold

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

循环数: 40

95°C 5 秒

60°C 20 秒

Stage 3: Melt Curve

注意:

本产品是利用 anti-Taq 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶, 与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比, 不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长, 会使酶的活性下降, 其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性, 通常设定为 95°C、30 秒。

3、标准曲线制作和结果分析

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线, 进行 PCR 定量时制作标准曲线等。

分析方法参见仪器的操作手册。

四、以 CFX96 Real-Time PCR Detection System 的操作方法为例

1、按下表配制 PCR 反应体系:

组织成分	20ul体系
Template DNA***	2 μ l
2x livningSYBR Premix EsTaq plus (withTli RNaseH)	12.5 μ l
Primer 1 (10 μ M)*	0.5 μ l
Primer 2 (10 μ M)*	0.5 μ l
ddH ₂ O	9.5 μ l
	25ul

*通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

** 20 μ l 反应体系中，DNA 模板的添加量要在 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，必要时需要进行梯度稀释，以确定合适的 DNA 模板添加量。

如果欲使用本产品进行 Two-Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2、进行 荧光定量 PCR 反应

建议采用下列显示的两步法 PCR 反应程序，如果该程序得不到良好的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化。由于使用 T_m 值较低的引物等原因，两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

两步法 PCR 扩增标准程序：

样品体积：25 μ l

Step 1: 95°C 30 秒

Step 2: PCR 反应

GOTO: 39 (40 Cycles)

95°C 5 秒

60°C 30 秒

Step 3: Melt Curve

注意：

本产品是利用 anti-Taq 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶，与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比，

不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、30 秒。

3、标准曲线制作和结果分析

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。

分析方法参见仪器的操作手册。

五、以 Thermal Cycler Dice Real Time System III and Lite 的操作方法为例

1、按下表配制 PCR 反应体系：

组织成分	20ul体系
Template DNA***	2 μ l
2x livningSYBR Premix EsTaq plus (withTli RNaseH)	12.5 μ l
Primer 1 (10 μ M)*	0.5 μ l
Primer 2 (10 μ M)*	0.5 μ l
ddH ₂ O	9.5 μ l
	25ul

*通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时,可以在 0.1~1.0 μM 范围内调整引物浓度。
** 20 μl 反应体系中, DNA 模板的添加量要在 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,必要时需要进行梯度稀释,以确定合适的 DNA 模板添加量。

如果欲使用本产品进行 Two-Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应, 第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2、进行 荧光定量 PCR 反应

建议采用下列显示的两步法 PCR 反应程序, 如果该程序得不到良好的实验结果时, 再进行 PCR 条件的优化。由于使用 T_m 值较低的引物等原因, 两步法 PCR 反应扩增性能较差时, 可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

两步法 PCR 扩增标准程序:

Stage 1: 预变性

Repeat: 1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Repeat: 40

95°C 5 秒

60°C 30 秒

Stage 3: Dissociation

注意:

本产品是利用 anti-Taq 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶, 与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比, 不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长, 会使酶的活性下降, 其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性, 通常设定为 95°C、30 秒。

3、标准曲线制作和结果分析

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线, 进行 PCR 定量时制作标准曲线等。

分析方法参见仪器的操作手册。

【实验条件优化】

如果按照推荐的两步法条件进行反应, 反应性能不好时, 请按照下面的方法进行引物和 PCR 反应条件的优化。另外, 根据反应情况选择特异性不同的 qPCRmix, 可提高 PCR 反应性能。实验条件选择时, 请从反应特异性与扩增效率两方面进行综合考虑。要求能同时满足这两个条件的反应体系, 才可以在较大浓度范围内进行很好的定量。

A、反应特异性高的实验体系应具备以下条件: No Template Control 时不产生引物二聚体等非特异性扩增。不产生目的片段以外的扩增。

B、扩增效率高的实验体系应具备以下条件: 扩增产物起峰更早 (C_t 值小)。PCR 扩增效率高 (接近理论值 100%)。

C、降低 Primer 浓度有助于提高特异性; 提高 Primer 浓度有助于提高扩增效率。

D、要提高反应特异性, 可以提高退火温度。要提高扩增效率, 可以增加延伸时间或变为 3 Step PCR 反应。

E、预变性条件通常设定为 95°C 30 秒, 使用此条件对于难变性的环状质粒 DNA 和基因组 DNA 模板基本上也能够很好的变性。如果对难变性的模板想改变变性条件, 可以延长至 1~2 分钟。但是时间过长酶容易失活, 不推荐使用 2 分钟以上的变性条件。

【引物设计】

进行荧光定量 PCR 反应时, 设计反应性能良好的 PCR 引物非常重要。根据以下原则, 可以设计 PCR 扩增效率高, 反应特异性强的良好引物。

PCR 扩增产物长度: 80~150 bp 较为合适 (可以延长至 300 bp)。

设计引物要求如下:

A、引物长度: 17~25 mers

B、GC 含量: 40~60% (45~55%理想)

C、 T_m 值: Forward Primer 和 Reverse Primer 的 T_m 值不能相差太大。

T_m 值的计算使用专用软件。OLIGO: 63~68°C Primer3: 60~65°C

- D、引物序列：A、G、C、T 整体分布尽量均匀。
不要有部分的 GC rich 或 AT rich（特别是 3' 端）。
避开 T/C (Polypyrimidine) 或 A/G (Polypurine) 的连续结构。
- E、3' 末端序列：避免 GC rich 或 AT rich。
3' 端碱基最好为 G 或 C。
尽量避免 3' 末端碱基为 T。
- E、互补序列：避开引物内部或两条引物之间有 3 个碱基以上的互补序列。
两条引物间的 3' 末端避开有 2 个碱基以上的互补序列。
特异性 使用 BIAST *3 检索确认引物的特异性。 *

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。