

产 品 说 明 书

2× SYBR Green qPCR Master Mix

产品货号: S2014S, S2014L

产品规格: 100T, 500T

产品内容:

组分	100T	500T
A. 2×SYBR Green Master Mix	1 mL	5×1 mL
B. 10 × ROX reference dye	0.5 mL	1 mL

组分 A 包含 SYBR Green dye, dNTP, PCR buffer (含 Tris 和 MgCl₂), 热启动 Taq 聚合酶; 组分 B 是 10 ×ROX 参比染料。

储存条件

长期保存请在-20℃避光保存, 有效期见外包装。使用前, 将产品室温下解冻, 并轻轻涡旋混匀, 解冻后所有实验应在冰上操作。该产品可以重新冷冻储存。

产品介绍

SYBR Green 是一种结合于所有 dsDNA 双螺旋小沟区域的具有绿色激发波长的染料。SYBR Green 与 dsDNA 结合荧光信号会增强 800-1000 倍, 是一种常用的 qPCR 荧光染料。具有高灵敏度, 信噪比高等优势, 可应用于基因表达差异分析, 基因芯片等。

使用方法

1. 取出 SYBR Green 2× Master Mix, 引物, 模板, RNase-free 水, 恢复至室温, 轻轻涡旋, 充分混匀。
2. 按照如下体系制备反应混合液:

反应组分	20 μL 反应体系	终浓度
2×SYBR Green Master Mix	10 μL	1×
F, R 引物	适量	各 0.1-0.5 μM
模板	适量	见注 ①
10× ROX	适量	见表 1

H ₂ O	补足至 20 μL	
------------------	-----------	--

注意事项:

① 模板浓度: 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, 确定合适的 DNA 模板添加量。cDNA 作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应总体积的 10%。

3. 轻轻涡旋混匀反应混合液, 转移固定体积至 PCR 管。
4. 您可以根据扩增模板的性质和仪器的功能, 选择以下三个程序之一进行实验。

A. 两步快速扩增法

这个程序适用于大多数引物 T_m 为 60℃的扩增, 熔解曲线遵循您所用仪器提供的标准流程执行。

程序	温度	时间	循环
酶启动	95℃	5 min	1
变性	95℃	5 s	45
退火	60℃	30 s	

B. 三步扩增法

这个程序适用于扩增温度比退火温度高的实验。例如, 如果扩增片段有相对较长的引物, 容易产生非特异性的扩增, 在更高的温度下进行延伸可以降低非特异性扩增。熔解曲线遵循您所用仪器提供的标准流程执行。



程序	温度	时间	循环
酶激活	95°C	5 min	1
变性	95°C	5 s	45
退火	50-60°C	5 s	
延伸	72°C	25 s	

C. 通用程序

此程序适用于几乎所有 qPCR 仪器，也适用于使用快速扩增法无法达到较好效果的扩增。

程序	温度	时间	循环
酶激活	95°C	5 min	1
变性	95°C	15 s	45
退火	60°C	60 s	

5. 将待检样品，放入 PCR 仪，运行 PCR 程序。

6. 分析实验数据。

注意事项

1. 参照染料 ROX：对于某些固定型号的仪器，必须添加 ROX 才能精确测定 Ct 值。ROX 的使用浓度可以参照下表。ROX 会给熔解曲线分析造成一定的背景干扰，因此，为了避免 ROX 杂峰干扰，在应用软件的“Passive Reference Dye”中不要选择检测 ROX 荧光值选项，然后进行资料的收集、分析。
2. 退火温度：退火温度应根据引物 Tm 值设定，通常是 50 - 60°C 为佳。不过，引物 Tm 值（和扩增温度）应该设计尽可能地接近 60°C（但仍在 50 - 60°C 范围内），减少退火和变性温度之间的差距。这样温度增加所需时间更少，进而扩增效率更高。

表 1、根据 PCR 仪种类不同，推荐 ROX 使用浓度

PCR Instrument	推荐 ROX 使用浓度	使用量 (20uL 体系)
BioRad: iCycler, MyiQ, MiQ 2, iQ 5, CFX-96, CFX-384, MJ Opticon, Option2, Chromo4; MiniOpticon Qiagen: Roto-Gene Q, Roto-Gene3000, Roto-Gene 6000; Eppendorf: Mastercycler realplex; Illumina: Eco RealTime PCR System; Cepheid: SmartCyler; Roche: LightCycler 480, LightCycler 2.0	No ROX	None
ABI: 7500, 7500 Fast, ViiA 7; Stratagene: MX4000P, MX3000P, MX3005P	Low ROX 0.05~0.1× (终浓度)	按 1:10 稀释 10× ROX; 添加 1~2 μL 稀释后的 1× ROX 至最终反应体系
ABI: 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOne plus	High ROX 1× (终浓度)	添加 2 μL 10× ROX 至最终反应体系

