

**BioEasy Master Mix
(SYBR Green, High ROX)
使用说明书**

TECHNICAL SUPPORT:

For technical support, please dial phone number : 0086-571-87774567-5215 or 5211, or fax to
0086-571-87774553

Email to reagent@bioer.com.cn.

Website: www.bioer.com.cn

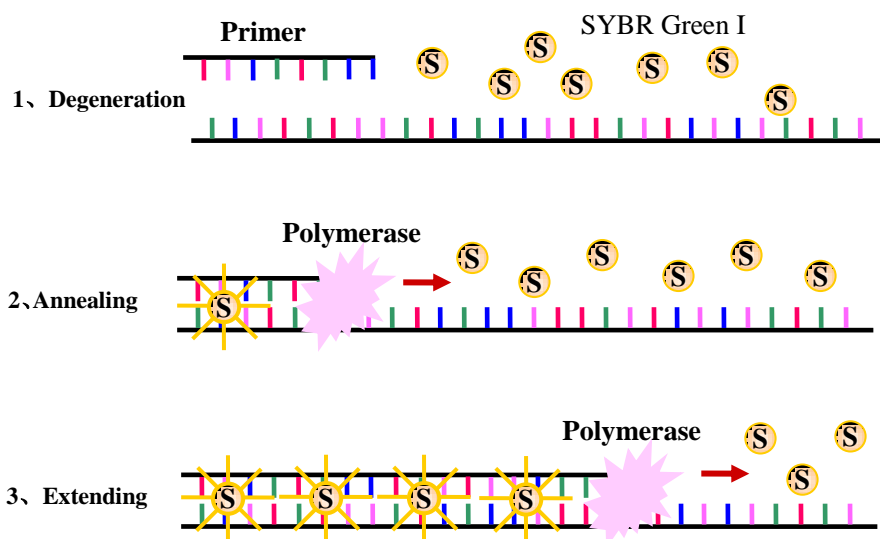
一、前言

本试剂盒是采用核酸扩增技术结合 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂，可以快速正确地对目的基因进行检测、定量。

本试剂盒提供 2×SYBR Green Mix，包含 High ROX 和其它组分，使用时只需加入引物、模板即可进行 Real Time PCR 反应，操作非常快捷简单；本试剂盒通过反应液组份的改良和更高品质酶的应用，使该试剂盒具有扩增效率高、特异性强、重复性好、灵敏度高等优点，对高 GC 序列的反应性和定量性也大大提高。

二、试剂盒原理

本试剂盒使用的 SYBR Green I 是一种荧光染料，该荧光染料最大吸收波长约为 497nm，发射波长最大约为 520nm，能特异性地掺入到双链 DNA 分子的小沟部位，发出荧光信号。在 PCR 反应体系中，当 SYBR Green I 染料与双链 DNA 结合，在激发光作用下发出荧光，通过测定荧光强度，即可确定双链 DNA 的含量。如下图所示：



荧光染料的优点是能监测任何 dsDNA 序列的扩增，不需要探针的设计，检测方法简便，且检测成本低。通过在 PCR 结束后直接进行融解曲线反应，以及对融解曲线的分析，可以判断 PCR 反应是否存在变异或非特异性扩增。

三、试剂盒组成

货号	BSB25L1B
试剂盒组成	200 人份
2×SYBR Green Mix (High ROX)	1250 ul×4

四、适用仪器：

本产品适用于杭州博日科技有限公司Line-gene系列荧光定量PCR检测系统及其它厂家同类仪器；特别适用于Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOne Plus™。

五、重要参数

1 模板

本试剂盒适用的模板为质粒 DNA (10-10⁷ 拷贝)、基因组 DNA (1pg-50ng) 和 cDNA (10pg-50ng)。为得到最好的实验结果，扩增的片段长度应在 80-500bp 范围内。

针对复杂模板可以延长预变性时间，但不可超过 5 分钟，否则会导致 Ct 值变大。

2 引物

引物是 Real Time PCR 反应的重要因素之一。在引物设计时，建议使用 Oligo、Primer5 等引物设计软件。引物的长度要求为 15-40bp。

在 PCR 反应时，引物终浓度通常在 50nM-200nM 之间调整，一般终浓度为 100nM 时可得较好的结果；**如果阴性对照有引物二聚体产生，可以适当降低引物用量。**

六、使用方法：

1 取出 2×SYBR Green Mix 上下轻缓颠倒混匀，在配制前可进行短暂离心，使用混匀器混匀时转速小于 1400。

2 PCR 反应液配制组份：（反应液配制时请在冰上进行）

试剂组份	体积 (ul)	体积 (ul)	体积 (ul)	终浓度
2×SYBR Green Mix ^①	25	10	5	1×
PCR Forward Primer (5uM)	1	0.4	0.2	100nM
PCR Reverse Primer (5uM)	1	0.4	0.2	100nM
Template DNA (<50ng) ^②	5	2	1	--
ddH ₂ O	18	7.2	3.6	--
Total ^③	50	20	10	--

① 2×SYBR Green Mix 内含 PCR buffer、Mg²⁺、dNTP mixture、SYBR Green I、Taq 酶等。

② 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 模板量。

③ 建议反应液体积为 50 ul。

3 充分混匀反应液(50ul 体系),按 45ul 分装至各个 PCR 反应管中。在每个 PCR 反应管中,各加入 5ul 模板。加入模板的体积可作适当调整,但不应超过 10ul。

4 将加好模板的 PCR 反应管混匀后进行短暂离心,以确保所有试剂流到 PCR 管底部。

5 PCR 反应

Real Time PCR 反应程序设置如下:

95°C, 1min ;

95°C, 15s

60°C, 1min

荧光信号采集设在 60°C

95°C, 1min ;

95°C, 15s

60°C, 15s

72°C, 30s

荧光信号采集设在 72°C (每循环第三步反应时);

注: 退火温度可以根据引物的退火温度来调整。

融解度曲线程序设置如下:

95°C, 1min;

65°C, 1min;

95°C, 20s, 步进 0.5°C/s,;

30°C, 1min。

使用 Line-gene 系列荧光定量PCR检测系统,仪器检测通道选择设定为 F1(SYBR Green I) 通道。在运行之前需要设置增益,选择自动增益,选定阴性试剂空白孔进行自动增益调节,使荧光本底值在 1000-1500 左右,也可根据试剂的实际情况调整。

七、结果分析与判定：

- 1 将标准品或参照物的浓度输入，选择样点拟合法进行分析，基线（零点调整）根据扩增曲线实际情况选取一段相对平稳（无异常波动）的拐点之前的荧光信号作为基线调整，噪声容限以基线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线（无规则的噪音线）的最高点，然后进行定量分析。也可根据仪器噪音情况另行调整。
- 2 分析后记录未知样品的浓度或 Ct 值。
- 3 融解曲线分析有自动分析和手动分析两种，根据需要进行选择。分析后记录 T_m 值。
- 4 也可以选择利用琼脂糖凝胶电泳检查分析 PCR 产物的特异性。

八、试剂盒使用注意事项

- 1 在实验前，请仔细阅读说明书。
- 2 本试剂盒仅供科研使用。
- 3 本试剂中含有荧光染料，保存试剂或配制 PCR 反应液时请避光放置。
- 4 **核酸扩增时容易污染，导致结果不可靠。**故要求在进行扩增实验时，严格按照标准 PCR 流程进行。

九、试剂盒保存条件

试剂盒须在-20℃避光长期保存，避免反复冻融 5 次以上，有效期 12 个月；否则可能导致试剂性能下降。如果试剂盒在 2 周内使用完，可在 2-8℃避光保存。