

BioEasy SYBR Green I Real Time PCR Kit

BioEasy SYBR Green I 荧光 PCR 试剂盒说明书

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×PCR 反应液，包含了除 Taq 酶与引物之外的其它所有组份。使用时只需加入引物、模板、Taq 酶即可进行 Real Time PCR 反应，操作非常快捷简单。

SYBR Green I 是一种荧光染料，能特异性地掺入到双链 DNA 分子的小沟部位，发射荧光信号。在 PCR 反应体系中，当 SYBR Green I 染料与双链 DNA 结合，在激发光的作用下发出荧光，通过荧光强度的测定，即可确定双链 DNA 的含量。荧光染料的优势在于它能监测任何 dsDNA 序列的扩增，不需要探针的设计，使检测方法变得简便，同时也降低了检测的成本。并且在 PCR 结束后可直接进行融解曲线反应分析。通过融解曲线的分析，能判断是否存在变异或非特异性的扩增。SYBR Green I 的最大吸收波长约为 497nm，发射波长最大约为 520nm。

二、试剂盒组成

货号	BSB03M1	BSB03L1
试剂盒组成	100 人份	200 人份
2×SYBR Mix (with 4.0mM Mg ²⁺)	1250 ul×2	1250 ul×4
Taq DNA Polymerase	32 ul	32 ul×2
25mM MgCl ₂	1000 ul	1000 ul×2
ddH ₂ O	1000 ul×2	1000 ul×4
ROX Reference (50×)	100 ul	200 ul

-20℃ 避光保存，避免反复冻融

三、适用仪器：

Line-gene 荧光定量 PCR 检测系统及其它同类仪器。

四、试剂盒质量控制

该产品以质粒 DNA 为模板，在 Line-Gene 荧光定量 PCR 检测系统上扩增，至少扩增四个梯度，其相关系数小于等于-0.980。

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 (100pg-1ug) 和 cDNA (1pg-100ng)。为得到最好的实验结果, 扩增的片段长度应在 80-500bp 范围内。

2 引物

引物是 Real Time PCR 反应的重要参数之一。在引物设计时, 建议使用 Oligo、Primer 5 等引物设计软件。在 PCR 反应时, 引物终浓度通常在 0.1uM-0.5uM 之间调整, 一般终浓度为 0.2uM 时可得较好的结果。

3 镁离子浓度

本试剂盒的 PCR 反应液已含有终浓度为 2.0mM 的镁离子, 一般情况即可得较好结果。但对于扩增不同的目的片段, 镁离子终浓度可作适当调整。本试剂盒中附送一管 25mM 氯化镁。根据下表使用量, 对镁离子终浓度作调整:

镁离子终浓度 (mM)	加入 25mM 氯化镁的量 (ul)
3.0	2
4.0	4
5.0	6
6.0	8

4 ROX Reference Dye

ROX Reference Dye 在使用 ABI、Stratagene 等公司的荧光定量 PCR 仪上, 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。具体如下:

仪器	每 50ul 体系加入 ROX Reference Dye (50×) 的量 (ul)
ABI7000, 7300, 7300, 7900HT, 7900HT Fast	1
ABI7500, Stratagene Mx3000, Mx3005P, and Mx4000	0.1

六、使用方法：

1 取出 2×PCR 反应液、ddH₂O, 进行室温解冻, 上下轻缓颠倒混匀, 在配制前可进行短暂离心。

2 PCR 反应液配制组分: (反应液配制时请在冰上进行)

试剂组分	体积 (ul)
2×SYBR Mix(with 4.0mM Mg ²⁺) ①	25
PCR Forward Primer (10uM)	1
PCR Reverse Primer (10uM)	1
Taq DNA Polymerase	0.3
ddH ₂ O	18.7
模板 ②	4
Total	50

① PCR 反应液内含 PCR buffer、Mg²⁺、dNTP mixture、SYBR Green I 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 模板添加量。

3 充分混匀反应液, 分装至各个 PCR 反应管中。在每个 PCR 反应管中, 各加入 4ul 模板——质粒 DNA (10–10⁷拷贝)、基因组 DNA (100pg–1ug) 或 cDNA (1pg–100ng)。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 反应管进行短暂离心, 以确保所有试剂流到管子底部。

5 PCR 反应

Real Time PCR 反应程序设置如下:

三步法反应程序设置如下: 94°C, 2min; 94°C, 10s, 60°C, 15s, 72°C, 30s; 40cycles 荧光信号采集设在 72°C (每循环第三步反应时);	二步法反应程序设置如下: 94°C, 2min; 94°C, 10s, 60°C, 30s; 40cycles 荧光信号采集设在 60°C (每循环第二步反应时);
--	--

融解度曲线程序设置如下：

95℃，2min；72℃，1min；

95℃，30s，步进 0.5℃/s；

30℃，1min。

在运行之前，调节增益使荧光本底值 ≤ 20 ，也可根据试剂的实际情况调整；仪器检测通道选择设定为 F1 (SYBR Green I)通道。

注：在进行 PCR 程序选择时，无特殊要求建议采用三步法程序进行扩增。若两步法的扩增结果与三步法的扩增结果一致，也可采用两步法替代三步法，以节约时间。

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，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，请仔细阅读此说明；
- 2 本试剂盒仅供科研使用，结果仅供参考。
- 3 融解后的试剂尽可能缩短常温放置时间，使用完毕后请立即保存于 -20°C 。
- 4 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。
- 5 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。