

## 2×PolarSignal® SYBR Green mix Taq (with Tli RNaseH) 使用说明书

产品名称	货号	规格	单位	储存条件
2×PolarSignal® SYBR Green mix Taq (with Tli RNaseH)	MKG900-01	1ml	包	-20°C
	MKG900-10	1ml*2	包	-20°C

### 【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×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。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】

	2×PolarSignal® SYBR Green mix Taq (with Tli RNaseH)*	ROX Reference Dye (50×)**	ROX Reference Dye II (50×)**
MKG900-01	1.0 ml	40 μl	40 μl
MKG900-10	10×1ml	2×200 μl	2×200 μl

由以下组分预混而成：EsTaq, dNTP Mixture, Mg<sup>2+</sup>, 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 在-20℃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: 各型号仪器操作详见官网说明

## 【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

## 【按下表配制 PCR 反应体系】

组分名称	50ul 体系	20ul 体系
Template DNA***	4μl	2μl
2×SYBR Green mix Taq (with Tli RNaseH)	25 μ l	10μl
Primer 1 (10 μ M)*	1μl	0.4μl
Primer 2 (10 μ M)*	1μl	0.4μl
ROX Reference Dye (50x) or ROX Reference Dye II (50x)**	1μl	0.4μl
ddH2O	18μl	6.8μl
	50μl	20ul

\*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。

\*\*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 (50X)。

\*\*\* 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

< 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**	2 $\mu$ l
2 $\times$ SYBR Green mix Taq (with Tli RNaseH)	10 $\mu$ l
Primer 1 (10 $\mu$ M)*	0.4 $\mu$ l
Primer 2 (10 $\mu$ M)*	0.4 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	7.2 $\mu$ l
	20ul

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

\*\* 20  $\mu$ 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	25ul 体系
Template DNA**	2μl
2×SYBR Green mix Taq (with Tli RNaseH)	12.5μl

Primer 1 (10 $\mu$ M)*	0.5 $\mu$ l
Primer 2 (10 $\mu$ M)*	0.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	9.5 $\mu$ l
	25 $\mu$ l

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

\*\* 20  $\mu$ 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:

组分名称	25ul 体系
Template DNA**	2 $\mu$ l
2 $\times$ SYBR Green mix Taq (with Tli RNaseH)	12.5 $\mu$ l
Primer 1 (10 $\mu$ M)*	0.5 $\mu$ l
Primer 2 (10 $\mu$ M)*	0.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	9.5 $\mu$ l
	25ul

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

\*\* 20  $\mu$ 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 $\mu$ l

Step 1: 95 $^{\circ}$ C

30 秒

Step 2:

PCR 反应

GOTO: 39

( 40

Cycles)

95  $^{\circ}$ C 5

秒

60 $^{\circ}$ 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:

组分名称	25ul 体系
Template DNA**	2μl
2×SYBR Green mix Taq (with Tli RNaseH)	12.5μl
Primer 1 (10 μM)*	0.5μl
Primer 2 (10 μM)*	0.5μl
ddH2O	9.5μl
	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<sub>m</sub> 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（Ct 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、Tm 值：Forward Primer 和 Reverse Primer 的 Tm 值不能相差太大。Tm 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