

## UltraSYBR Mixture (High ROX)

项目号: U665701

保存条件: -20℃, 如需频繁使用, 可存放于2-8℃, 尽量避免反复冻融。

### 产品内容

Component	U665701-5ml
2×UltraSYBR Mixture (High ROX)	5×1ml
ddH <sub>2</sub> O	5×1ml

### 产品简介

UltraSYBR Mixture (High ROX) 是专用于染料法 (SYBR Green I) 实时荧光定量PCR的预混体系, 浓度为2×, 包含GoldStar Taq DNA Polymerase、PCR Buffer、dNTPs、SYBR Green I 荧光染料和Mg<sup>2+</sup>和High ROX校正染料, 操作简单方便。主要用于基因组DNA靶序列和RNA反转录后cDNA靶序列的检测。

本品所含的荧光染料SYBR Green I可以与所有的双链DNA结合, 使该产品可用于不同靶序列的检测而不需合成特异性标记探针。本品含有的GoldStar Taq DNA Polymerase是一种经化学修饰的、全新高效热启动酶, 在常温下没有聚合酶活性, 有效避免在常温条件下由引物和模板非特异性结合或引物二聚体而产生的非特异性扩增, 酶的激活须在95℃下孵育10分钟。独特的PCR缓冲体系与热启动酶的组合, 有效抑制了非特异性的PCR扩增, 显著提高了PCR的扩增效率。

所含的ROX染料可校正定量PCR仪孔与孔之间产生的荧光信号误差, 本试剂盒中ROX校正染料含量较高, 适用于ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One/Step One Plus等需要较高ROX信号进行校正的荧光定量PCR仪。

### 产品特点

1. 本产品中使用了全新高效热启动酶GoldStar Taq DNA Polymerase与独特的PCR缓冲体系, 显著提高PCR的扩增效率, 具有高灵敏度和特异性强的特点。
2. 适用于荧光定量PCR检测, 能够准确地对目的基因进行定量和检测。

### 注意事项

1. 使用前请上下颠倒轻轻混匀, 尽量避免起泡, 并经短暂离心后使用。
  2. 本产品中含有SYBR Green I荧光染料和ROX染料, 保存本产品或配制PCR反应液时应避免强光照射。
  3. 避免反复冻融本品, 反复冻融可能使产品性能下降。
  4. 本品不能用于探针法荧光定量PCR。
- 配制反应液时, 请使用新的或者无污染的枪头和离心管, 尽量防止污染。

### 使用方法

以下举例为常规PCR反应体系和反应条件, 实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

#### 1. PCR反应体系

试剂	50 μl 反应体系	终浓度
2×UltraSYBR Mixture (High ROX)	25 μl	1×
Forward Primer, 10μM	1 μl	0.2 μM <sup>1)</sup>
Reverse Primer, 10μM	1 μl	0.2 μM <sup>1)</sup>
Template DNA	2 μl <sup>2)</sup>	
ddH <sub>2</sub> O	up to 50 μl	

注意：1) 通常引物浓度以 $0.2 \mu\text{M}$ 可得到较好结果，可以终浓度 $0.1-1.0 \mu\text{M}$ 作为设定范围的参考。

2) 通常DNA模板的量以 $10-100\text{ng}$ 基因组DNA或 $1-10\text{ng}$  cDNA为参照，因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。

3) 推荐反应体系为 $50 \mu\text{l}$ ，也可以根据实际实验需求按比例扩大或者缩小反应体系。

## 2. PCR反应程序：

注意！本产品预变性反应必须在 $95^\circ\text{C}$  10分钟下完成！

建议采用下表显示的两步法PCR进行程序设定，本程序是以ABI7900荧光定量PCR仪为例。若因 $T_m$ 值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法PCR扩增，三步法操作步骤详见《反应条件的优化》。

步骤	温度	时间
预变性	$95^\circ\text{C}$	$10\text{min}^{1)}$
变性	$95^\circ\text{C}$	15s
退火/延伸 <sup>2)</sup>	$60^\circ\text{C}$	1min
融解曲线分析 <sup>3)</sup>		
	$95^\circ\text{C}$	15s
	$60^\circ\text{C}$	1min
	$95^\circ\text{C}$	15s
	$60^\circ\text{C}$	15s

注意：1) 本产品所采用的热启动酶须在预变性 $95^\circ\text{C}$ 、 $10\text{min}$ 条件下实现酶的活化。

2) 退火温度请以 $60-64^\circ\text{C}$ 作为设定范围的参考，发生非特异性反应时，可提高退火温度。

3) 本程序是以ABI 7900荧光定量PCR仪为参照设定，融解曲线分析请以所使用的荧光定量PCR仪推荐的程序进行设定。

## 反应条件的优化

在荧光定量反应条件优化时，应从引物浓度、退火温度、延伸时间等方面进行考虑，以提高反应特异性和扩增效率。

### 1. 反应特异性和扩增效率高的实验体系应具备以下条件：

- 1) 反应特异性高：阴性对照无引物二聚体等非特异性扩增；不产生目的片段以外扩增。
- 2) 扩增效率高： $C_t$ 值低；PCR扩增效率高，接近理论值100%。

### 2. 反应条件优化方法：

1) 引物浓度：通常引物浓度以 $0.2 \mu\text{M}$ 可得到较好结果，可以终浓度 $0.1-1.0 \mu\text{M}$ 作为设定范围的参考。若提高反应特异性，可降低引物浓度；若提高扩增效率，可增加引物的浓度，由此优化反应体系。

2) 退火温度：建议采用两步法PCR，退火温度 $60^\circ\text{C}$ 进行反应。若提高反应特异性，可提高退火温度，以 $60-64^\circ\text{C}$ 作为设定范围的参考。若因使用 $T_m$ 值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法PCR扩增，三步法的退火温度请以 $56^\circ\text{C}-64^\circ\text{C}$ 的范围作为设定参考。

3) 延伸时间：建议采用两步法PCR，延伸时间1min进行反应。若提高扩增效率，可尝试将延伸时间增加，或尝试三步法PCR。

注意！本产品预变性反应必须在 $95^\circ\text{C}$  10分钟下完成！

三步法荧光定量PCR（本程序是以ABI7900荧光定量PCR仪为例）：

步骤	温度	时间
预变性	95°C	10min <sup>1)</sup>
变性	95°C	10s
退火	56-64°C <sup>2)</sup>	30s
延伸	72°C	32s <sup>3)</sup>
融解曲线分析 <sup>4)</sup>		
	95°C	15s
	60°C	1min
	95°C	15s
	60°C	15s

注意：1) 本产品所采用的热启动酶须在预变性95°C、10min条件下实现酶的活化。

2) 无法得到理想的扩增效率时，适当降低退火温度；发生非特异性反应时，提高退火温度。

3) 若需提高反应扩增效率，可适当增加延伸时间。

4) 本程序是以ABI 7900荧光定量PCR仪为参照设定，融解曲线分析请以所使用的荧光定量PCR仪推荐的程序进行设定。