

# SYBR® Green Premix Taq HS qPCR Kit

AT5701-01/02 使用说明书

## 产品简介

本制品是利用 SYBR® Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 的试剂盒，是 2X premix 型试剂，反应液配制十分简单，仅需加入引物、模板及 RNase free water 即可。本制品对 SYBR® Green I 浓度、PCR 反应体系都进行了优化，采用了反应性能优越的 Taq HS DNA polymerase 体系，能够有效抑制非特异性产物的扩增，提高 PCR 扩增效率，可以在宽广的定量区域内得到良好的扩增，从而达到准确的检测。

## 试剂盒组成

产品成分	AT5701-01 (100 次)	AT5701-02 (500 次)	保存条件
2X SYBR Green Taq HS Premix	1mL	5mL	-20℃
ROX Reference Dye	40μL	200μL	-20℃

## 注意事项

1. 请仔细阅读所用定量 PCR 仪器设备操作手册，根据仪器操作手册进行操作。
2. 请使用不含 RNA 酶或 DNA 酶的枪头、EP 管进行试验。
3. 产品避免反复冻融，防止酶活降低；使用前可上下颠倒混匀，请勿涡旋振荡混匀，防止酶活降低，同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。
4. 产品中含有 SYBR® Green I，因此溶液操作过程中要注意避免强光照射。
5. 产品-20℃存放可能会产生淡黄色或白色沉淀，使用前可于冰上溶解或手握放置，颠倒混匀至沉淀全部消失。请勿使用涡旋振荡。

## 需自备试剂和耗材

RNase free water；定量 PCR tube、无核酶枪头；

## 根据仪器选择设备说明书要求确定是否需要添加 ROX Reference Dye

	仪器
无需添加 ROX	(Bio-Rad)IQ5, CFX96, CFX384, CFX Connect, MJOpticon, Opticon 2;
	(Cepheid) SmartCycler®System, Smart Cycler II System;
	(Roche) LightCycler®2.0, 480, 96;
	(Qiagen) Rotor-Gene Q, 3000, 6000;
	(Bioer) Line-Gene;
	(Eppendorf) Mastercyclerpreplex;
	(Analytik Jena) qTOWER3;
添加高浓度 ROX	(Thermo) ABI7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus;
添加低浓度 ROX	(Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA7, QuantStudio 3 / 5, QuantStudio 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™Dx;
	(Agilent) Mx3000P, Mx3005P, MX4000;

## 操作步骤

### 一、配制 PCR 反应液

组分名称	20 $\mu$ L 体系	50 $\mu$ L 体系
2X SYBR Green Taq HS Premix	10 $\mu$ L	25 $\mu$ L
Template	< 100 ng	< 200 ng
Primer F (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L	1.0 $\mu$ L
Primer R (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L	1.0 $\mu$ L
ROX Reference Dye*	0.4 $\mu$ L	1.0 $\mu$ L
RNase free water	Up to 20 $\mu$ L	Up to 50 $\mu$ L

注：若是需添加高浓度的 ROX，则直接使用本试剂盒提供的；若是需添加低浓度的 ROX，则需将试剂盒提供的 ROX 稀释 5 倍后使用。

### 二、qPCR 反应条件

两步法 PCR 反应程序：

	温度	时间	循环数
Step 1	95 $^{\circ}$ C	30 sec	1
Step 2	95 $^{\circ}$ C	5 sec	} 40
	60 $^{\circ}$ C	30 sec	
Step 3	Dissociation stage		

注：

- 1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序，如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件；如果引物  $T_m$  值较低，导致两步法扩增效率较差，可采用三步法进行 PCR 扩增。
- 2: 预变性温度通常设定为 30 sec，如果模板变性困难，可以延长预变性时间至 1~2 min。
- 3: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下，扩增延伸反应条件设定为 60 $^{\circ}$ C、30sec 时可以满足要求；如需提高反应特异性，可适当提高退火温度；如需提高扩增效率，或者 PCR 扩增产物较长，则可将反应延伸时间适当延长，同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。

### 结果检测

反应结束后，确认扩增曲线和融解曲线，并进行标准曲线分析。