



Color PreMix Kit (SYBR Green)

彩色荧光定量预混试剂盒(SYBR Green)

一、产品规格

产品组成	BLGE146-01 (125rxn)	BLGE146-02 (500rxn)	BLGE146-03 (2500rxn)
2×PreMix (SYBR Green, blue)	1.25ml	4×1.25ml	5×BLGE146-02
50×ROX Reference Dye	250μl	1ml	
40×Dilution Buffer (Yellow)	1.25ml	1.25ml	
RNase-Free ddH ₂ O	2×1ml	5×1ml	

二、产品情况

Color PreMix Kit(SYBR Green)试剂盒选用Real Time PCR专用试剂进行SYBR Green I 嵌合荧光法qPCR反应，核心成分为高效化学修饰、新型抗体法制备、耐热Taq DNA聚合酶。为充分发挥热启动酶特异性强、灵敏度高的特点，本品配套改良了缓冲液体系，使其更具扩增速率快、得率高、特异性强和可信区间宽的优势，对不同丰度、来源的靶基因都极为适用。产品特色如下：

- 1.额外添加了蓝色指示剂与黄色样本稀释液，将有利于大量样品的稀释和加样，减少操作误差；
- 2.Buffer 体系中平衡了 K⁺和 NH₄⁺的比例，从而增加了扩增的可信区间、稳定性和特异性；
- 3.预混液中只需加入模板、引物、RNase-Free ddH₂O 便可进行 Real Time PCR 反应，操作简单方便、快捷；
- 4.ROX Reference Dye 可方便用户选用针对不同型号的荧光定量 PCR 仪，本品的核心组分能充分消除信号本底、校正孔、批间差等带来的荧光信号误差。

三、储存运输

本品需在-30~-15℃条件下避光保存；运输条件应≤0℃。

本品解冻后，可在 2~8℃避光条件下稳定存放 3-6 个月。

四、注意事项

（一）实验前，待使用的 2×PreMix 和 50×ROX Reference Dye 请充分解冻。2×PreMix 解冻后可能会出现少许白色沉淀，请室温放置 2min 并轻柔颠倒混匀，待溶液成分完全均一后再行使用。

（二）解冻后如未使用，须彻底混匀后重新冻存。非均一的混合液在冻融过程中，会形成的

盐晶体出现分层、析出现象，对酶活性造成损害。

(三) PCR 反应的预变性条件必须设定为 95°C 15min，用以充分激活耐热聚合酶。

(四) PCR 反应液中各颜色指示剂的终浓度应为 1×，请根据模板的用量计算 Dilution Buffer 的使用量。

(五) 20μl 反应体系中，建议基因组 DNA 或 cDNA 模板的使用量 ≤100ng；逆转录产物作为模板时，使用量应 ≤PCR 体系终体积的 10%。当模板浓度较低时，可直接用 cDNA 原液作为模板使用，未稀释的模板不会影响定量结果。

(六) 避免反复多次冻融；本品含有荧光染料 SYBR Green I 保存或配制时应避免强光照射。

(七) 使用前，可上下颠倒或快速离心以充分混匀试剂，请不要使用涡旋仪避免出现泡沫。

(八) 引物终浓度为 0.3μM 时，扩增效果最为稳定；如需要进一步优化，可以在 0.2-0.5μM 范围内微调引物浓度。

五、实验流程

(一) 自备产品

RNase-free 1.5ml 离心管、PCR 管、移液器及吸头、PCR 仪、冰或移动冰盒

(二) 实验准备

1. 设定各相应规格的反应体系；

2. 解冻模板、引物、2×PreMix、50×ROX Reference Dye、40×Dilution Buffer 和 RNase-Free ddH₂O；并将所有试剂在室温条件下平衡、混匀。

(三) Real Time PCR 反应液的配制

1. 在 qPCR 管中配制以下溶液 A，冰上操作：

组分	终浓度	20μl 体系	25μl 体系	50μl 体系
2×PreMix	1×	10μl	12.5μl	25μl
正向引物(10μM)	0.3μM◎	0.6μl	0.75μl	1.5μl
反向引物(10μM)	0.3μM◎	0.6μl	0.75μl	1.5μl
cDNA 模板★	pg~ng	/	/	/
50×ROX Reference Dye◆	/	/	/	/
RNase-free ddH ₂ O	/	至 20μl	至 25μl	至 50μl

注意：2×PreMix 为蓝色；40×Dilution Buffer 为黄色；稀释模板后，最终反应体系应为绿色。如颜色不符，请确认反应体系中加入组分是否正确。

2. 确认常见仪器匹配的 ROX Reference Dye 的浓度

仪器	终浓度
ABI7500/7500 Fast/ViiA 7;QuantStudio™;12K Flex;Agilent Mx3000P/Mx3005P/Mx4000	1× (如 1 μl ROX/50μl 体系)
ABI 5700/7000/7300/7700/7900HT/StepOne™/StepOne Plus™	5× (如 5 μl ROX/50μl 体系)
Roche 仪器;Bio-Rad 仪器;Eppendorf 仪器等	无需添加

注意：◎0.3μM 的引物终浓度最为适宜。可增加浓度提高扩增效率；减少浓度降低非特异性扩增；建议在 0.2-0.5μM 范围内优化引物用量。

★将 cDNA 模板与 40× Dilution Buffer 按一定比例混合成稀释模板，使 Dilution Buffer 在定量体系中的终浓度为 1×。

◆常见仪器匹配的 ROX Reference Dye 的浓度，见上表。

（四）进行 Real time PCR 反应

1. 两步扩增法（常规方法）

反应	循环	温度	时间	原理	荧光信号
预变性	1×	95℃	15min	预变性	不采集
PCR	40×	95℃	10sec	变性	不采集
		60-66℃♣1	20-32sec*	退火/延伸	采集
熔解曲线分析(Melting/Dissociation Curve Stage)					

2. 三步扩增法（模板浓度和引物 Tm 值低、非特异扩增强、扩增曲线重复性差等时，可采用该法）

反应	循环	温度	时间	原理	荧光信号
预变性	1×	95℃	15min	预变性	不采集
PCR	40×	95℃	10sec	变性	不采集
		50-60℃♣2	20sec	退火	不采集
		72℃	20-32sec*	延伸	采集
熔解曲线分析(Melting/Dissociation Curve Stage)					

3. 请按照仪器使用说明书进行实验操作，不同型号仪器的时间设定*如下，

Roche LightCycler/ LightCycler 480	20sec
ABI 7500 Fast/7900HT/7900HT Fast/ViiA 7; StepOne/StepOnePlus	30sec
ABI 7000/7300	31sec
ABI 7500	32sec

注意：♣1 常规使用 60°C 退火温度扩增；如需要优化，可尝试在 60-66°C 范围内进行。

♣2 常规引物退火温度比引物的解链温度(Tm)低 5°C，如引物碱基数较少，可适当提高退火温度提高 PCR 特异性；如果碱基数较多，则可适当减低退火温度。

4. 盖上反应管，并瞬时离心确保组成混匀。

5. 将反应体系置于荧光定量 PCR 仪中，开始反应。

六、常见问题及处理方案

无扩增曲线出现	A. 反应循环数不够； B. 反应循环数过多，增加背景信号； C. 程序中未设置信号采集步骤； D. 引物降解； E. 模板浓度过低； F. 模板降解。
扩增曲线异常	A. 曲线不光滑：需提高模板浓度重复实验，或确认 ROX 与机型是否匹配； B. 曲线断裂或下滑：需调整模板浓度，或减小基线终点，重新分析数据； C. 曲线骤降：检查反应管内是否有气泡。
C _T 值异常	A. 出现太晚 (1)尝试三步扩增法，优化反应条件或重新设计引物，提高扩增效率； (2)减少稀释度重复实验，提高模板浓度； (3)重新制备模板，确认模板是否降解； (4)评估 PCR 产品是否在 80~150bp，防止过长； (5)加到模板稀释倍数，或重新制备模板重复实验，防止体系中存在由模板带入的 PCR 抑制剂。 B. 阴性对照中出现扩增带 (1)反应体系污染； (2)引物二聚体干扰。
熔解曲线异常	A. 引物设计不适宜； B. 引物浓度过高； C. cDNA 模板有基因组污染。
实验重复性差	A. 加样误差； B. 标准品降解； C. 模板浓度不适宜； E. PCR 仪模块内置温度不一致。