**MesGenTM PreMix ( SYBR Green )** **荧光定量预混试剂**

****

**目录编号：MRT4469-A, MRT4469-B, MRT4469-C**

**产品简介**

MesGenTM PreMix （SYBR Green）是实时定量PCR扩增所需的预混和溶液，是采用SYBR Green I荧光染料法进行Real Time PCR的专用试剂。本SYBR Green Mix由经化学修饰的Taq DNA聚合酶、dNTP混合物、最佳浓度的SYBR Green 及经优化后的缓冲液等扩增必需组分（模板与引物除外）所组成的2×浓度混合试剂。

**产品原理**

SYBR Green法的基本原理是SYBR Green能结合到DNA双螺旋的小沟。处于溶解状态的SYBR Green染料未结合双链DNA时显示低的荧光强度，一旦结合到双链DNA之后荧光信号会明显增强，所以可通过检测反应体系中的SYBR Green 荧光强度，达到检测PCR产物扩增量的目的。PCR反应时生成双链DNA，且随着PCR反应的进行，双链DNA数量指数级增加，SYBR Green与双链DNA结合发出荧光强度也随着DNA数量的增加而增强，通过检测PCR反应液中的荧光信号强度，可以对目的基因进行准确定量，同时SYBR Green法还可以通过溶解曲线分析测定扩增的目的DNA片段的溶解温度从而检测扩增的特异性。

**特点与优势**

1. 快速：广泛适用于Real Time PCR反应，使用两步法可快速、准确的对目的基因进行检测或定量；
2. 简捷：在2×浓度的Mix中，预先混有SYBR® Green I，PCR反应液配制时，只需加入模板、引物、灭菌蒸馏水便可进行Real Time PCR反应，操作简单方便。
3. 高特异性：Mix混合液中含有经化学修饰后的DNA 聚合酶，可以使用Hot Start法进行PCR，可有效避免常温操作时所带来的非特异扩增，避免繁琐的冰上操作。同时与开发改良的缓冲液系统相结合，使特异性能得到大大改善，可有效抑制引物二聚体及非特异性扩增的发生（图1，2）。
4. 高灵敏性：能有效检测低拷贝数模板量，在等同模板量使用的前体下，MesGenTM产品经40循环扩增后具有更低的Ct值及更高的信号值（图3）。
5. 广泛适用性：本制品在极大模板用量范围内不仅对常规长度80-150bp的DNA片段具高效的扩增效率(图2，4)，对长度达300bp的片段仍表现出较强的扩增优势（图5）。此外GC含量高达65%，75%的DNA片段仍能在该体系中实现扩增（图6，7）。
6. 溶解曲线峰形改善：本制品所扩增片段的溶解曲线具有更窄更尖，对称性好的特点（图4）。
7. 高重复性：优化的反应体系及严格的质量检测有效控制试剂盒批内及批次差异，保证试验间的高度重复性与可现性。

**规格与组成**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **产品货号** | **试剂盒组成** | **包装A（20μl×125 rxn）** | **包装B（20μl×500 rxn）** | **包装C（20μl×5000 rxn）** |
| MAR4469 | SYBR Green Mix (2×) | 1×1.25ml | 4×1.25ml | 10×4×1.25ml |
| RNase-Free ddH2O | 250μl | 1ml | 10×1ml |
| 试剂配套相应ROX Dye (50×) | 2×1ml | 5×1ml | 10×5×1ml |

***说明：****体系中包含除模板，引物及稀释用水外的所有PCR扩增所需必备成分; ROX Dye仅使用在ABI及Stratagene等公司所产Real Time PCR扩增仪上，用以校正PCR反应孔间所产生的荧光信号误差。使用ABI PRISM 7000/7700/7900HT，7300 Real Time PCR System及Step-One/Step-One Plus时请使用ROX Dye A，使用ABI 7500 Real Time PCR System，7500 Fast Real Time PCR System，Stratagene及Agilent公司的荧光定量PCR仪器时使用ROX Dye B。在使用Light Cycler，Smart Cycler System等Real Time PCR 扩增仪时不需要向反应体系中添加任何一种ROX Dye。*

*具体仪器型号所推荐的ROX使用方法参加如下：*

***无需添加ROX型号：****Roche Applied Science Light Cycler 480; Reference Dye Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; Cepheid SmartCycler®; Eppendorf Mastercycler® ep realplex, realplex 2 s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Thermo Scientific PikoReal Cycler.*

***添加ROX(终浓度为1 x ):*** *Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOnePlus™*

***添加ROX (终浓度为0.1 x ):*** *Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA™7; Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™*

**图示**

|  |  |
| --- | --- |
| SG2  NTC Tm图1. MesGen(蓝)与A公司类似产品(绿)NTC组PCR后引物二聚体溶解曲线图。 | SG1  TKR CK Tm（红CK）  图2. MesGen (红)与A公司(粉)类似产品PCR后的溶解曲线图(127bp，55%GC)。 |
| SG2  样品'  图3. MesGen (红)与A公司 (粉)类似产品样品组组扩增曲线图(188bp，52%GC)。 | SG2  TKR CK Tm（红CK）图4. MesGen (红)与A公司(粉)类似产品样品组组扩增曲线图(188bp，52%GC)。 |
| SG3  TKR CK Tm（绿CK）图5. MesGen (绿)与A公司(粉)类似产品样品组组扩增曲线图(306bp，57.8%GC)。 | SG4  TKR CK Tm（红CK）'图6. MesGen (红)与A公司(粉为二聚体峰)类似产品样品组组扩增曲线图(120bp，65%GC)。 |
| SG5  TKR CK Tm（绿TKR）'  图7. MesGen (粉)与A公司绿为二聚体峰)类似产品样品组组扩增曲线图(146bp，75%GC，含SNP位点)。 | 图8. 典型三种溶解曲线。灰-NTC组二聚体峰；棕-样品组产物峰；黄-样品组产物峰及非特异产物峰。 |

**储存条件**

在使用前推荐-20℃避光保存，在使用后推荐4℃避光保存，避免反复冻融。

**操作方法**

1. 溶解2×SYBR Green Mix，模板，引物和RNase-Free ddH2O，并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀。

2. 冰上进行Real Time PCR反应液的配制，体系如下：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **组成成分** | **50ul体系** | **25ul体系** | **20ul体系** | **终浓度** |
| 2×SYBR Green Mix | 25μl | 12.5μl | 10μl | 1× |
| ROX Dye (50×) | —— | —— | —— | 视仪器型号而定 |
| 正向引物（10 μM） | 1-2μl | 0.5-1μl | 0.4-0.8μl | 200-400nM \* |
| 反向引物（10 μM） | 1-2μl | 0.5-1μl | 0.4-0.8μl | 200-400nM \* |
| cDNA模板 | —— | —— | —— | 1-100ng |
| RNase-Free ddH2O | 至50μl | 至25μl | 至20μl | —— |

*\*引物终浓度为200-400nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时，可增加PCR反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少PCR反应体系中的引物浓度。基因组模板推荐使用1-100ng，cDNA模板推荐使用1-20ng。ROX Dye具体添加类型需根据不同荧光定量PCR仪进行调整。*

3. 进行Real time PCR反应（本试剂盒推荐使用两步PCR反应法进行Real Time PCR反应），反应程序如下：

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 反应 | | 温度 | 时间 | 循环数 |
| 荧光定量PCR | 预变性 | 95℃ | 2min | 1 |
| 变性 | 95℃ | 5S \*1 | 40-50 |
| 退火 | 60℃ | 25S \*2 |
| 延伸 |
| 融解曲线分析\*3 | | 95℃，1min；60℃,1min；升温至95℃；升温过程中每℃收集五次信号 | | 1 |

*\*1 在扩增高GC含量片段时可适当增加变性时间至15-30s。*

*\*2 具体退火延伸时间可根据所扩增片段长度及荧光定量PCR仪器做适当调整,300bp内推荐25s，ABI7500仪器若无法使用25s，请调整至仪器最短可用时间。*

*\*3 溶解曲线分析程序可根据不同机器或个人需要进行调整。*

**相关建议**

1. 在配制、分装反应液时请一定使用新的（无污染的）枪头、离心管等，避免污染。
2. 在配制PCR反应液时我们不建议每管均单独配制。在需要同时进行N个反应时，推荐预先配制N+2次PCR反应所需各种成分的混合物，并使用可进行连续滴定的电子移液枪将上述PCR混合液分加于每个PCR反应管中，这样可保证较高的实验重复性及可信度。
3. 在PCR反应时强烈推荐每个反应设置三管重复，同时在每次反应时均设置NTC（No template control）组，即阴性对照组，在检测体系污染的同时可检测体系扩增特异性。
4. 在进行Real Time PCR时为获得良好实验结果并保证较好的实验重复性，强烈推荐使用紫外分光光度计对引物的实际浓度进行测定（测定方法见引物浓度测定）。

**附录1引物设计说明**

设计反应性能良好的PCR引物对使用该试剂盒进行Real Time PCR至关重要。我们推荐按照如下原则设计PCR引物，从而提高扩增效率，提高反应特异性。PCR扩增产物长度：80-200bp为最佳(可延长至300bp)，GC含量最高可提高至75%。

|  |  |
| --- | --- |
| **引物长度** | 17～25 bp |
| **GC含量** | 40～60%（45～55%最佳） |
| **Tm值** | 尽量保证Forward Primer和Reverse Primer两引物Tm值一致。Tm值计算软件：Oligo：63～65℃；Primer Premier 5：60～62℃；Primer Express：58～60℃ |
| **引物序列** | A、G、C、T整体分布尽量均匀，避免GC rich或AT rich（特别是3'端），避免连续碱基，尤其是G。3'端碱基最好为G或C，避免A或T。 |
| **二级结构** | 引物内部避免形成发夹结构及二聚体，两引物间避免有互补序列，二条引物间3'末端避开有2个碱基以上的互补序列。 |
| **特异性** | 使用BLAST检索确认引物的特异性。 |

**附录2引物浓度测定**

鉴于国内厂家所合成引物的浓度与实际浓度存在较大差距，对于普通PCR此种差距对实验不会造成很大影响，但对Real Time PCR时，将给实验带来很大的差异，为此强烈推荐在进行Real Time PCR时必须对所用引物的实际浓度进行测定。

具体测定及计算方法为：

|  |  |
| --- | --- |
| **1** | 将引物溶于TE缓冲液中稀释100倍，紫外分光光度计测定260nM吸光值OD260。 |
| **2** | 计算每条引物的总吸光系数。总吸光系数=Σ（单碱基吸光系数×引物碱基数目）。 |
| **3** | 算引物浓度(μM)计算公式为由OD260=总吸光系数×光程×浓度C/100得到：浓度C=100×[OD260/(总吸光系数×光程)] |

如下为引物浓度计算实例：在该例中引物序列为CGTACTCGTTCGTGCTGC。将引物溶解于TE缓冲液中并稀释100倍。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **碱基类型** | **吸光系数** | **碱基数目** | **总吸光系数** |
| A | 15200 | 1 | 15200 |
| C | 7050 | 6 | 42300 |
| G | 12010 | 5 | 60050 |
| T | 8400 | 6 | 50400 |
| **总计** | **——** | **——** | **167950** |

紫外分光光光度计测定OD260=0.13，总吸光系数=167950 M-1cm-1，比色皿光程=0.3cm

将上述数值带入公式OD260=总吸光系数×光程×浓度/100中为：0.13=167950 M-1cm-1×0.3cm×C/100 则C=258μM。

******

***For Research Use Only. Not Intended for Diagnostic or Therapeutic Use.***