

# MesGen™ PreMix ( SYBR Green ) 荧光定量预混试剂

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

**MESGEN**  
INNOVATION BIOTECHNOLOGY

## 产品简介

MesGen™ 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, MesGen™ 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 ddH <sub>2</sub> O	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 :

**MESGEN**  
INNOVATION BIOTECHNOLOGY

MesGen Biotech

website : [www.MesGenbio.com](http://www.MesGenbio.com)

E-mail : [sales@mesgenbio.com](mailto:sales@mesgenbio.com)

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

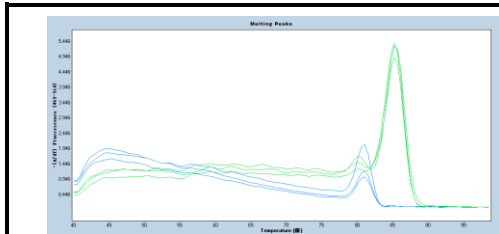


图 1. MesGen(蓝)与 A 公司类似产品(绿)NTC 组 PCR 后引物二聚体溶解曲线图。

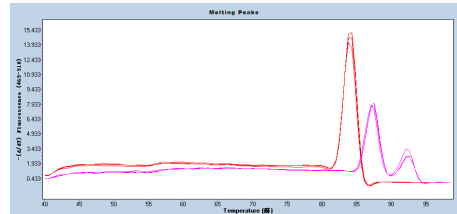


图 2. MesGen (红)与 A 公司(粉)类似产品 PCR 后的溶解曲线图(127bp, 55%GC)。

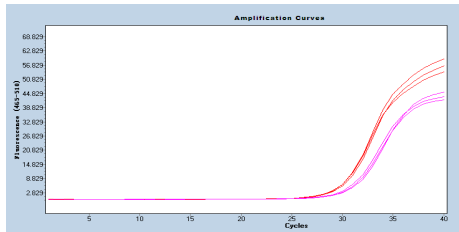


图 3. MesGen (红)与 A 公司 (粉)类似产品样品组扩增曲线图(188bp, 52%GC)。

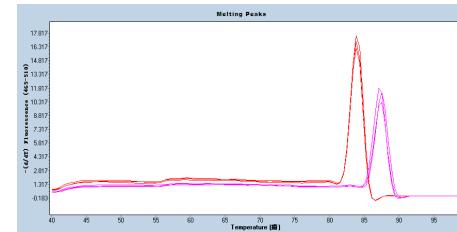


图 4. MesGen (红)与 A 公司(粉)类似产品样品组扩增曲线图(188bp, 52%GC)。

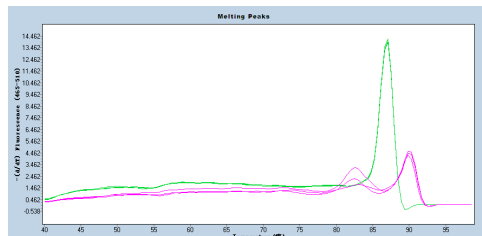


图 5. MesGen (绿)与 A 公司(粉)类似产品样品组扩增曲线图(306bp, 57.8%GC)。

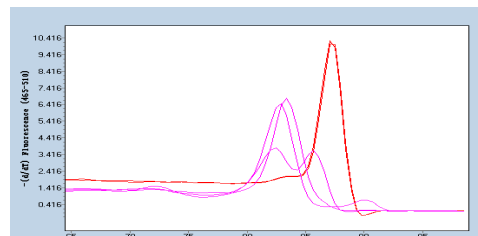


图 6. MesGen (红)与 A 公司(粉为二聚体峰)类似产品样品组扩增曲线图(120bp, 65%GC)。

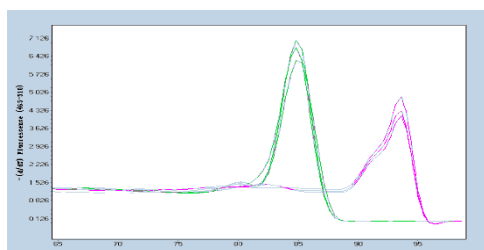


图 7. MesGen (粉)与 A 公司绿为二聚体峰)类似产品样品组扩增曲线图(146bp, 75%GC, 含 SNP 位点)。

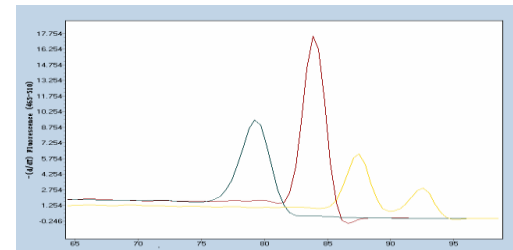


图 8. 典型三种溶解曲线。灰-NTC 组二聚体峰；棕-样品组产物峰；黄-样品组产物峰及非特异产物峰。

## 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 ddH<sub>2</sub>O，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 ddH <sub>2</sub> O	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%。

<b>引物长度</b>	17 ~ 25 bp
<b>GC 含量</b>	40 ~ 60% ( 45 ~ 55%最佳 )
<b>Tm 值</b>	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°C ;Primer Premier 5 : 60 ~ 62°C ; Primer Express : 58 ~ 60°C
<b>引物序列</b>	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。
<b>二级结构</b>	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。
<b>特异性</b>	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：

<b>1</b>	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。
<b>2</b>	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 )。
<b>3</b>	算引物浓度(μM)计算公式为由 $OD_{260} = \text{总吸光系数} \times \text{光程} \times \text{浓度} C / 100$ 得到：浓度 $C = 100 \times [OD_{260} / (\text{总吸光系数} \times \text{光程})]$

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
<b>总计</b>	—	—	<b>167950</b>

紫外分光光度计测定  $OD_{260} = 0.13$ ，总吸光系数 =  $167950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，比色皿光程 =  $0.3\text{cm}$

将上述数值带入公式  $OD_{260} = \text{总吸光系数} \times \text{光程} \times \text{浓度} / 100$  中为： $0.13 = 167950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 0.3\text{cm} \times C / 100$  则  $C = 258\mu\text{M}$ 。



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