



NuHi® Robustic SYBR Green Mix 使用说明书

货号：NH9211

产品规格：2X

适用仪器

NuHi® Robustic SYBR Green Mix 中含有 ROX 参比染料，适用于所有荧光定量 PCR 仪。

储存条件

-20℃ 储存。使用时推荐小量分装，避免反复冻融。由于含有 ROX 染料，需避光保存。

产品简介

NuHi® Robustic SYBR Green Mix 是采用 SYBR Green I 荧光染料法进行 Real Time PCR 的专用试剂。由经化学修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶和精心优化的扩增体系（包含 dNTP 混合物、SYBR Green 染料、缓冲液等）组成。

本制品适用于目的基因（80-300bp）的 PCR 扩增及 SYBR Green I 荧光染料法 Real Time PCR。

在进行 Real Time PCR 时，仅需加入模板和引物并将扩增体系稀释至 1×，即可进行实验，可简化操作，缩短操作时间，降低污染。

原理

SYBR Green 法的基本原理是 SYBR Green I 能结合到 DNA 双螺旋的小沟。处于溶解状态的 SYBR Green I 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。PCR 反应时，随着反应的进行，双链 DNA 数量呈指数级增加，SYBR Green I 与双链 DNA 结合发出的荧光也随着双链 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，还可以通过熔解曲线分析，测定扩增产物片段的熔解温度，从而检测扩增的特异性。

特点与优势

- 1、快速：使用两步法可快速、准确地对目的基因进行检测或定量。
- 2、简便：PCR 反应液配制时，只需加入模板、引物、纯水，操作简单方便。
- 3、灵敏：能有效检测低拷贝数模板量，在同等模板量的前提下，本产品可得到更低的 Ct 值及更高的信号值。
- 4、高特异性：经化学修饰后的 DNA 聚合酶，优化后的缓冲液系统，可有效抑制引物二聚体及非特异性扩增。
- 5、常温操作：本产品所用酶在常温时无酶活，不会进行扩增反应，故可在常温下操作。
- 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。



7、广泛适用：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，对长度达 300bp 的片段仍表现出较强的扩增优势。

8、高重复性：优化的反应体系，保证实验间的高度重复性与可现性。

注意事项

以下为使用本品的注意事项，请务必在使用前认真阅读。

1、使用时请上下轻轻颠倒混合均匀（请勿使用振荡器，避免起泡），并轻微离心后使用。若试剂未混匀，其反应性能会有所下降。

2、本制品中含有荧光染料 SYBR® Green I，保存制品或配制 PCR 反应液时应避免强光照射。

3、在配制、分装反应液时请一定使用新（无污染的）枪头、离心管等。

4、在配制 PCR 反应液时不建议每管单独配制。若需同时进行 N 个反应，推荐预先配制 N+1 或 N+2 次 PCR 反应所需各种成分的混合物，同时推荐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，以保证较高的实验重复性及可信度。

5、在 PCR 反应时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，一则检测体系是否存在污染，二则检测引物是否会形成引物二聚体。

6、为获得良好实验结果，保证较好的实验重复性，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)。

7、请按照本说明书中“引物设计说明”，进行引物设计。

使用方法

以 Roche LightCycler® 480 为例，介绍本产品的使用方法。在使用其他仪器设备进行检测时，请根据自己仪器的特性进行调整。

1、按照下表配制 qPCR 反应液。

试剂	使用量	试剂终浓度
NuHi® Robustic SYBR Green Mix (2×)	12.5µl	1×
PCR Forward Primer (10µM) *1	0.5µl	200nM
PCR Reverse Primer (10µM) *1	0.5µl	200nM
DNA 模板 *2	1µl	1-100ng
灭菌水	Up to 25µl	/

*1 为获得最佳的扩增效果，推荐使用 200nM 引物浓度，以 NTC 无二聚体峰为最佳。若反应性能比较差时，可以在终浓度 200nM-400nM 范围内进行引物浓度的调整优化。

*2 基因组模板推荐使用 1-100ng，cDNA 模板推荐使用 1-20ng。若使用未稀释的 cDNA 原液作为模板时，其体积不应超过 qPCR 反应总体积的 10%。使用质粒等其他样品作为模板时，最好能够确定合适的拷贝数



作为起始模板量。

2、PCR 反应液配制完成后，上下颠倒混匀并离心，将反应液分装，加入 96 孔 PCR 反应板中，约 2000g/min 转速下离心 1-2min，封口膜封口，置于仪器中进行 PCR 反应。

3、Real Time PCR 反应

推荐使用两步 PCR 反应法进行 Real Time PCR 反应。当出现模板浓度过低引起非特异扩增，引物 Tm 值较低导致的扩增效率低下或扩增曲线重现性不佳等现象时，建议尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

两步法反应程序为：

反应		温度	时间	循环数
荧光定量 PCR	预变性	95℃	2min ^{*1}	1
	变性	95℃	5S ^{*2}	40-50
	退火	55-68℃ ^{*3}	25S ^{*4}	
	延伸			
溶解曲线分析 ^{*5}		95℃，1min；60℃,1min；升温至 95℃； 升温过程中收集信号		1

三步法反应程序为：

反应		温度	时间	循环数
荧光定量 PCR	预变性	95℃	2min ^{*1}	1
	变性	95℃	5S ^{*2}	40-50
	退火	50-55℃ ^{*6}	5S	
	延伸	68℃	25S ^{*4}	
溶解曲线分析 ^{*5}		95℃，1min；60℃,1min；升温至 95℃； 升温过程中收集信号		1

*1 激活时间为 2min。延长激活时间时，扩增特异性会降低。

*2 在扩增高 GC 含量片段时，可适当增加变性时间至 15-30 秒。

*3 请先使用 60℃ 进行扩增。如果需要进一步优化，可以尝试在 55-68℃ 范围内进行

*4 扩增片段长度 300bp 以内，推荐退火延伸时间 25 秒。其他仪器设备的退火延伸时间，可根据仪器自身设置及所扩增片段长度做适当调整。

*5 溶解曲线分析程序，可按照不同仪器的默认设置进行运行。

*6 通常引物退火温度比引物的解链温度(Tm)低 5℃，如果引物碱基数较少，可以适当提高退火温度，这样可以使 PCR 的特异性增加；如果碱基数较多，那么可以适当减低退火温度。



4、结果分析

反应结束后，结合 Real Time PCR 反应扩增曲线及溶解曲线进行结果分析。

引物设计说明

使用该试剂盒进行 Real Time PCR 时，设计反应性能良好的 PCR 引物至关重要。我们推荐按照如下原则设计 PCR 引物，从而能够提高 PCR 扩增效率，提高 PCR 反应特异性。

PCR 扩增产物长度：80-150bp 为最佳(可延长至 300bp)，GC 含量最高可提高至 75%。

引物设计原则如下：

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°C Primer Premier 5: 60~62°C Primer Express: 58~60°C(强烈推荐)
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。
引物二级结构	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。

引物浓度测定

部分引物合成厂家提供的引物量与实际量偏差较大。对于普通 PCR，此种偏差对实验不会造成很大差异，但在进行 Real Time PCR 时，此种浓度偏差将给实验带来很大的差异。为此，强烈推荐在进行 Real Time PCR 前，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 OD ₂₆₀ 。
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	按照如下公式计算引物浓度(μM) 浓度 C=100×[OD ₂₆₀ /(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，引物浓度是如此测定并计算的。
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

紫外分光光度计测定 $OD_{260}=0.13$

总吸光系数= $167950 M^{-1}cm^{-1}$

比色皿光程= $0.3cm$

将上述数值带入公式浓度 $C=100 \times [OD_{260}/(\text{总吸光系数} \times \text{光程})]$ 中，计算结果为：

$C=258\mu M$

常见问题及处理

1、无扩增信号或扩增曲线起峰晚或仅有引物二聚体

- 加样错误或试剂问题：检查试剂浓度和保存条件，包括所使用的引物和模板。重复进行实验。
- 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段；三步法扩增程序应当将信号采集设置在 $68^{\circ}C$ 延伸阶段。
- PCR 条件、引物序列或浓度不当：请确认引物未发生降解，引物浓度及 PCR 条件，扩增不好时，通常先尝试降低退火温度，延长退火时间和提高引物浓度，有时也可以提高退火温度，增加延伸时间，降低升温速度。对于 GC 含量高的模板，可以适当延长变性时间。如果还是扩增不好，请重新设计引物。
- 起始模板问题：检查起始模板的浓度，保存条件和质量。重新对模板进行线性梯度稀释，并用新稀释模板进行实验。增加起始模板使用量。模板中存在抑制剂，重新纯化模板或降低模板使用量。

2、NTC 出现较高的荧光值

- 试剂污染：建议使用新试剂进行实验。
- PCR 反应液配制时发生污染：采取必要的防污染策略，如使用带滤芯的枪头、反应体系在超净工作台内配制等。
- 引物出现降解：可以使用变性聚丙烯酰胺胶检测引物降解情况。
- 引物使用量过高：重新测定引物浓度，确定反应体系中引物终浓度。

3、出现引物二聚体和（或）非特异扩增

- PCR 退火温度太低：建议进行退火温度梯度实验，可以按照 $2^{\circ}C$ 梯度进行退火温度



优化。

- PCR 产物太长: 荧光定量 PCR 产物长度最好在 100-150 bp 之间, 尽量不超过 500 bp。
- 引物出现降解: 可以使用变性聚丙烯酰胺胶检测引物降解情况。
- 引物用量过高: 重新测定引物浓度, 确定反应体系中引物终浓度。
- 引物设计不合适: 考虑重新设计引物序列。
- 计量误差: 反应体积太小会导致检测精度下降。请根据定量 PCR 仪推荐的反应体积重新实验

4、实验重现性差

- 仪器方面的故障: 因为仪器的不适用, 在温度管理或检测时产生重现性差。请根据相应仪器的说明书进行点检。
- 模板纯度不好: 不纯的模板会导致实验的重现性差。
- 稀释的模板放置太久: 通过梯度稀释的模板最好现配现用。
- 模板浓度太低: 模板浓度越低, 重复性越差, 减少模板稀释度或提高加样体积。
- 引物质量下降: 尽量避免新合成引物批次间的差异, 可以使用原来质量好的引物做为对照。
- PCR 反应条件、引物浓度、序列等不恰当: 扩增效率差的 PCR 容易产生重现性差。通过变更引物的浓度或 PCR 反应条件来进行调整。扩增不好时, 一般可降低退火温度或提高引物浓度, 也可以延长延伸时间。如模板的 GC 含量较高, 可延长变性时间。仍得不到改善时, 建议重新设计引物。
- 计量误差: 反应体积太小会导致检测精度下降。请根据定量 PCR 仪推荐的反应体积重新实验

5、扩增曲线形状异常

- 扩增曲线不光滑: 信号太弱, 经系统矫正后产生。提高模板浓度重复实验。
- 扩增曲线断裂或下滑: 模板浓度较高, 基线的终点值大于 CT 值。减小基线终点(CT 值-4), 重新分析数据。
- 个别扩增曲线突然骤降: 反应管内留有气泡。处理样本时要注意离心, 进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

6、CT 值出现太晚

- 扩增效率极低: 优化反应条件, 尝试三步法扩增程序, 或者重新设计合成引物。
- 模板浓度太低: 减少稀释度重复实验, 一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- 模板降解: 重新制备模板, 重复实验。
- PCR 产物太长: 推荐 PCR 产物长度为 80 bp-150 bp。
- 模板中存在抑制剂: 加大模板稀释倍数或者重新制备或纯化模板重复实验。

7、绝对定量时标准曲线线性关系不佳



- 加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积。
- 标准品降解：重新制备标准品，重复实验。
- 模板浓度太高：提高模板稀释倍数。

联系方式

苏州新海生物科技股份有限公司 NuHigh Biotechnologies Co., Ltd

地址：苏州工业园区星湖街 218 号生物纳米科技园 C8 楼 301 单元

邮编：215123

电话：0512-69561912

传真：0512-69561913

网址：www.nuhighbio.com