

2X Livning Fast SYBR Premix EsTaq (with Tli RNaseH)

使用说明书

产品名称	单位	货号
2X Livning Fast SYBR Premix EsTaq (with Tli RNaseH)	50 µl 反应 × 40 次	LV-MF787S
2X Livning Fast SYBR Premix EsTaq (with Tli RNaseH)	50 µl 反应 × 200 次	LV-MF787M
2X Livning Fast SYBR Premix EsTaq (with Tli RNaseH)	50 µl 反应 × 400 次	LV-MF787L

【储存条件】

长期保存，请置于-20℃，有效期 24 个月。经常使用，可置于 4℃ 保存至少六个月。

【产品简介】

本产品采用 Sybrgreen 嵌合荧光法进行荧光定量的专用试剂。制品中含有荧光定量反应的最适浓度 Sybrgreen，是一种 2×浓度的预混试剂，进行实验时，PCR 反应液的配制十分方便简单。制品中使用了 antiTaq 抗体的 Hot Start 法用 DNA 聚合酶，与荧光定量反应适合 Buffer 组合，可以有效抑制非特异性的 PCR 扩增，大大提高 PCR 的扩增效率，可以进行高灵敏度的荧光定量扩增反应。

另外，本产品中添加了 Tli RNaseH (耐热性 RNaseH)，以 cDNA 作为模板进行 PCR 反应时，可以很好地抑制由于 cDNA 中残存 mRNA 对 PCR 反应造成的阻害作用。适合于快速荧光定量扩增反应，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量、检测，重复性好，可信度高。

【产品组份】

	LV-MF787S	LV-MF787M
2x Livning Fast SYBR Premix EsTaq (with Tli RNaseH) *	1.0 ml	5x1ml
ROX Reference Dye (50×) **	40µl	200µl
ROX Reference Dye II (50×) **	40µl	200µl

*由以下组分预混而成：EsTaq, dNTP Mixture, Mg²⁺, Tli RNaseH, Sybrgreen。

** ROX Reference Dye 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。例如使用 Applied Biosystems 的 Real Time PCR 扩增仪进行实验就需要校正。

- ◆ 需要使用 ROX Reference Dye 校正的仪器 Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- ◆ 需要使用 ROX Reference Dye II 校正的仪器 Applied Biosystems 7500 和 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- ◆ 不需要校正的仪器 Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990) Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (Code No. TP700/TP760) Smart Cycler II System (Cepheid) LightCycler/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics) CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

【使用注意】

- 使用前，请上下轻轻颠倒混匀，避免产生气泡，防止因混合不均匀造成的反应效果不佳。但请勿涡旋振荡混匀。
- Sybrgreen Premix EsTaq 在-20℃存放可能会产生白色或淡黄色的沉淀，可用手握缓慢溶解，于室温短时间避光放置，轻柔上下颠倒混匀直至沉淀全部消失。沉淀会导致溶液成分不均匀，使用前务必充分混匀试剂。
- 配制反应液时，试剂请于冰上放置。反应液的配制、分装请一定使用新的（无污染的）枪头、Microtube 等，尽量避免污染。
- 本制品中含有荧光染料 Sybrgreen，配制 PCR 反应液时应避免强光照射。

【所需试剂】

本产品为 2×预混荧光定量 PCR 反应体系，使用时只需加入模板、引物和水，使其工作浓度为 1×,即可进行反应。具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点，可最大限度地减少人为误差、节约 PCR 实验操作时间、降低污染几率。

【操作示例】

注意：请严格按照不同仪器的操作手册进行实验。

一、以 Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 和 StepOnePlus Real-Time PCR System 的操作方法

1、按下表配制 PCR 反应体系：

Template DNA***	EsTaq (with Tli RNaseH)	4 µl	2µl
2x M5 HiPer SYBR Premix		25 µl	10µl
Primer 1 (10µM)*		1 µl	0.4µl
Primer 2 (10µM)*		1 µl	0.4µl
ROX Reference Dye (50x)	or ROX Reference Dye II (50x)**	1 µl	0.4µl
ddH ₂ O		18 µl	6.8µl
		50 µl	20ul

*通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μM 范围内调整引物浓度。

**ROX Reference Dye II(50x)比 ROX Reference Dye(50x)浓度低，使用 7500 /7500 Fast Real-Time PCR System 时，请使用 ROX Reference Dye II(50x)。使用 ABI PRISM 7300 Real-Time PCR System 和 StepOnePlus 时，请使用 ROX Reference Dye(50x)。

*** 20 μl 反应体系中，DNA 模板的添加量要在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时需要进行梯度稀释，以确定合适的 DNA 模板添加量。

如果欲使用本产品进行 Two-Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2、进行 荧光定量 PCR 反应

< Applied Biosystems 7300/7500 和 StepOnePlus Real-Time PCR System >

两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性 循环数：1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应 循环数：40

95°C 5 秒

60°C 30~34 秒*

Dissociation stage *

使用 StepOnePlus 时请设定 在 30 秒。使

用 7300 时请设定在 31 秒。

使用 7500 时请设定在 34 秒。

<Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System>

两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性 循环数: 1 95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应循环数: 40

95°C 3 秒

60°C 30 秒

Stage 3: Melt Curve

注意：

- 1) 本产品是利用 anti-Taq 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶，与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比，不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、30 秒。
- 2) 如果以上两步法程序得不到良好的实验结果时，请再进行 PCR 条件的优化。由于使用 T_m 值较低的引物等原因，两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

3、标准曲线制作和结果分析

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。分析方法参见仪器的操作手册

二、以 LightCycler/LightCycler480 System 的操作方法为例

1、按下表配制 PCR 反应体系

组分名称	20ul 体系
Template DNA**	2 μl
2x Living Fast SYBR Premix EsTaq (withTli	10 μl
RNaseH) Primer 1 (10 μM)*	0.4 μl
Primer 2 (10 μM)*	0.4 μl
ddH ₂ O	7.2 μl
	20ul

*通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 μM 范围内调整引物浓度。

** 20 μl 反应体系中，DNA 模板的添加量要在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时需要进行梯度稀释，以确定合适的 DNA 模板添加量。

如果欲使用本产品进行 Two-Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

北京市丰台区贾家花园15号院7号楼2B353

热线电话：(86) 010-58435458

2、进行 荧光定量 PCR 反应

PCR 反应用毛细管请用离心机轻轻离心后放入 LightCycler 中进行荧光定量 PCR 反应。建议采用下列显示的两步法PCR 反应程序，如果该程序得不到良好的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化。由于使用 Tm 值较低的引物等原因， 两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

< LightCycler> 两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性 循环数：1

95°C 30 秒 20°C/秒

Stage 2: PCR 反应 循环数：40 95

°C 5 秒 20°C/秒

60°C 20 秒 20°C/秒

Stage 3: 融解曲线分析95°C 0 秒

20°C/秒

65°C 15 秒 20°C/秒

95°C 0 秒 0.1°C/秒

< LightCycler 480 System>两步法 PCR 扩增标准程序：

变性

95°C 30 秒 (Ramp rate: 4.4°C/秒) 1 cycle

PCR

分析模式：定量分析

95°C 5 秒 (Ramp rate: 4.4°C/秒)

60°C 30 秒. (Ramp rate: 2.2°C/秒, Acquisition Mode : Single) 40 cycles

融解

分析模式：融解曲线

95°C 5 秒 (Ramp rate: 4.4°C/秒)

60°C 1 分钟 (Ramp rate: 2.2°C/秒)

95°C (Ramp rate: 0.11°C/秒, Acquisition Mode : Continuous, Acquisitions : 5 per°C) 1 cycle

降温

50°C 30 秒 (Ramp rate: 2.2°C/秒) 1 cycle

注意：

本产品是利用 anti-Taq 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶，与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比， 不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、30 秒。

3、标准曲线制作和结果分析

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。分析方法参见仪器的操作手册。

三、 以 Smart Cycler II System 的操作方法为例

1、按下表配制 PCR 反应体系：

组分名称	25ul 体系
Template DNA**	2µl
2x Living Fast SYBR Premix EsTaq (with Tli	12.5µl
RNaseH) Primer 1 (10µM)*	0.5µl
Primer 2 (10µM)*	0.5µl
ddH ₂ O	9.5µl
	25ul

*通常引物终浓度为 0.2 µM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 µM 范围内调整引物浓度。

** 20 µl 反应体系中，DNA 模板的添加量要在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时需要进行梯度稀释，以确定合适的 DNA 模板添加量。

如果欲使用本产品进行 Two-Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2、进行 荧光定量 PCR 反应

PCR 反应管请用离心机轻轻离心后放入 Smart Cycler 中进行荧光定量 PCR 反应。建议采用下列显示的两步法 PCR 反应程序，如果该程序得不到良好的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化。由于使用 T_m 值较低的引物等原因，两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性Hold

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应循环
数: 40

95°C 5 秒

60°C 20 秒

Stage 3: Melt Curve

注意：

本产品是利用 anti-Taq 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶，与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比，不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活化反应。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、30 秒。

3、标准曲线制作和结果分析

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。分析方法参见仪器的操作手册。

四、以 CFX96 Real-Time PCR Detection System 的操作方法为例

1、按下表配制 PCR 反应体系：

组分名称	25ul 体系
Template DNA**	2μl
2x Living Fast SYBR Premix EsTaq (withTli RNaseH)	12.5μl
Primer 1 (10μM)*	0.5μl
Primer 2 (10μM)*	0.5μl
ddH2O	9.5μl
	25ul

*通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整引物浓度。

** 20 μl 反应体系中，DNA 模板的添加量要在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时需要进行梯度稀释，以确定合适的 DNA 模板添加量。

如果欲使用本产品进行 Two-Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2、进行 荧光定量 PCR 反应

建议采用下列显示的两步法 PCR 反应程序，如果该程序得不到良好的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化。由于使用 T_m 值较低的引物等原因，两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

两步法 PCR 扩增标准程序：

样品体积：	25 μl
Step 1：	95°C 30 秒
Step 2：	PCR 反应
GOTO：	39 (40 Cycles)
95°C	5 秒
60°C	30 秒
Step 3：	Melt Curve

注意：

本产品是利用 anti-Taq 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶，与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比，不需要 PCR 反应前的 95°C、5 ~ 15 分钟的酶的活化反应。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、30 秒。

3、标准曲线制作和结果分析

北京市丰台区贾家花园15号院7号楼2B353

热线电话：（86）010-58435458

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。

分析方法参见仪器的操作手册。

五、

以 Thermal Cycler Dice Real Time System III and Lite 的操作方法为例

1、按下表配制 PCR 反应体系

组分名称	25ul 体系
Template DNA**	2μl
2x Living Fast SYBR Premix EsTaq (withTli RNaseH)	12.5μl
Primer 1 (10μM)*	0.5μl
Primer 2 (10μM)*	0.5μl
ddH ₂ O	9.5μl
	25ul

*通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整引物浓度。

** 20 μl 反应体系中，DNA 模板的添加量要在 100 ng 以下。因不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时需要进行梯度稀释，以确定合适的 DNA 模板添加量。

如果欲使用本产品进行 Two-Step RT-PCR 反应的第二步 PCR 扩增反应，第一步的 RT 反应液作为 DNA 模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2、进行荧光定量 PCR 反应

建议采用下列显示的两步法 PCR 反应程序，如果该程序得不到良好的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化。由于使用 T_m 值较低的引物等原因，两步法 PCR 反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1 :	预变性
Repeat :	1
95°C	30 秒
Stage 2 :	PCR 反应
Repeat :	40
95°C	5 秒
60°C	30 秒
Stage 3 :	Dissociation

注意：

本产品是利用 anti-Taq 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶，与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比，不需要 PCR 反应前的 95°C、5 ~ 15 分钟的酶的活化反应。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、30 秒。

3、标准曲线制作和结果分析

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 PCR 定量时制作标准曲线等。

分析方法参见仪器的操作手册。

【实验条件优化】

如果按照推荐的两步法条件进行反应，反应性能不好时，请按照下面的方法进行引物和 PCR 反应条件的优化。另外，根据反应情况选择特异性不同的 qPCRmix，可提高 PCR 反应性能。实验条件选择时，请从反应特异性与扩增效率两方面进行综合考虑。要求能同时满足这两个条件的反应体系，才可以在较大浓度范围内进行很好的定量。

A、反应特异性高的实验体系应具备以下条件：

No Template Control 时不产生引物二聚体等非特异性扩增。

不产生目的片段以外的扩增。

B、扩增效率高的实验体系应具备以下条件：

扩增产物起峰更早 (Ct 值小)。

PCR 扩增效率高 (接近理论值 100%)。

C、降低 Primer 浓度有助于提高特异性；提高 Primer 浓度有助于提高扩增效率。

D、要提高反应特异性，可以提高退火温度。要提高扩增效率，可以增加延伸时间或变为 3 Step PCR 反应。

E、预变性条件通常设定为 95°C 30 秒，使用此条件对于难变性的环状质粒 DNA 和基因组 DNA 模板基本上也能够很好的变性。如果对难变性的模板想改变变性条件，可以延长至 1 ~ 2 分钟。但是时间过长酶容易失活，不推荐使用 2 分钟以上的变性条件。

【引物设计】

进行荧光定量 PCR 反应时，设计反应性能良好的 PCR 引物非常重要。根据以下原则，可以设计 PCR 扩增效率高，反应特异性强的良好引物。

北京市丰台区贾家花园15号院7号楼2B353

热线电话：（86）010-58435458

PCR 扩增产物长度：80 ~ 150 bp 较为合适（可以延长至 300 bp）。

设计引物要求如下：

- A、引物长度：17 ~ 25 mers
- B、GC 含量：40 ~ 60%（45 ~ 55%理想）
- C、Tm 值：Forward Primer 和 Reverse Primer 的 Tm 值不能相差太大。

Tm 值的计算使用专用软件。OLIGO：63 ~ 68°C Primer3：60 ~ 65°C

- D、引物序列：A、G、C、T 整体分布尽量均匀。

不要有部分的 GC rich 或 AT rich（特别是 3' 端）。

避开 T/C（Polypyrimidine）或 A/G（Polypurine）的连续结构。

- E、3' 末端序列：避免 GC rich 或 AT rich。

3' 端碱基最好为 G 或 C。

尽量避免 3' 末端碱基为 T。

- E、互补序列：避开引物内部或两条引物之间有 3 个碱基以上的互补序列。

两条引物间的 3' 末端避开有 2 个碱基以上的互补序列。

特异性 使用 BIAST *3 检索确认引物的特异性。