2X M5 HiPer SYBR Premix EsTaq (with Tli RNaseH)
使用说明书

产品名称	单位	货号
2X M5 HiPer SYBR Premix EsTaq (with Tli RNaseH)	50 μl 反应 × 40 次	MF787-T
2X M5 HiPer SYBR Premix EsTaq (with Tli RNaseH)	50 μl 反应 × 200 次	MF787-01
2X M5 HiPer SYBR Premix EsTaq (with Tli RNaseH)	50 μl 反应 × 400 次	MF787-02

友情提醒：您可以用以前的 qPCR 配置体系、以前的 qPCR 程序，一切照旧！（因此，不用看后面冗长的说明书）

【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】

	MF787-T	MF787-01
2x M5 HiPer SYBR Premix EsTaq (withTli 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，Mg^{2+}，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】

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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 的操作方法为例

1、按下表配制 PCR 反应体系:

组分名称	50ul 体系	20ul 体系
Template DNA***	4 μl	2μl
2x M5 HiPer SYBR Premix EsTaq (withTli RNaseH)	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_2O	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(50×)。

*** 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℃ 30 秒

Stage 2：PCR 反应 循环数：40
95℃ 5 秒
60℃ 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℃ 30 秒

Stage 2： PCR 反应　　循环数: 40
95℃　3 秒
60℃　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℃、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℃、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 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。

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**	2μl
2x M5 HiPer SYBR Premix EsTaq (withTli RNaseH)	10μl
Primer 1 (10μM)*	0.4μl
Primer 2 (10μM)*	0.4μl
ddH_2O	7.2μl
	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%。

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℃　30 秒　　20℃/秒

Stage 2：PCR 反应　　循环数：40
95℃　5 秒　　20℃/秒
60℃　20 秒　　20℃/秒

Stage 3：融解曲线分析
95℃　　0 秒　20℃/秒
65℃　　15 秒　20℃/秒

95℃ 0 秒 0.1℃/秒

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

变性
95℃ 30 秒（Ramp rate：4.4℃/秒）
1 cycle

PCR
分析模式：定量分析
95℃ 5 秒 (Ramp rate：4.4℃/秒)
60℃ 30 秒. (Ramp rate：2.2℃/秒，Acquisition Mode : Single)
40 cycles

融解
分析模式：融解曲线
95℃ 5 秒 (Ramp rate：4.4℃/秒)
60℃ 1 分钟 (Ramp rate：2.2℃/秒)
95℃ (Ramp rate：0.11℃/秒, Acquisition Mode : Continuous, Acquisitions : 5 per℃)
1 cycle

降温
50℃ 30 秒 (Ramp rate：2.2℃/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℃、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℃、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 M5 HiPer SYBR Premix EsTaq (withTli RNaseH)	12.5μl
Primer 1 (10μM)*	0.5μl
Primer 2 (10μM)*	0.5μl
ddH_2O	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 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。

两步法 PCR 扩增标准程序：
Stage 1：预变性
Hold
95℃ 30 秒

Stage 2：PCR 反应
循环数：40
95℃ 5 秒
60℃ 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℃、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℃、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 M5 HiPer SYBR Premix EsTaq (withTli RNaseH)	12.5μl
Primer 1 (10μM)*	0.5μl
Primer 2 (10μM)*	0.5μl
ddH_2O	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 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。

两步法 PCR 扩增标准程序：

样品体积：25 μl
Step 1：95℃ 30 秒

Step 2：PCR 反应

GOTO：39（40 Cycles）
95℃ 5 秒
60℃ 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℃、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℃、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。

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 M5 HiPer SYBR Premix EsTaq (withTli RNaseH)	12.5μl
Primer 1 (10μM)*	0.5μl
Primer 2 (10μM)*	0.5μl
ddH_2O	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 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。

两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1：预变性
Repeat：1
95℃ 30 秒

Stage 2：PCR 反应
Repeat：40
95℃ 5 秒
60℃ 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℃、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℃、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℃ 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。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℃ Primer3：60～65℃

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。 *

【备注】
本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。