

4. 将 PCR 管放入热循环仪并启动循环程序。

5. 进行 PCR 产物熔解曲线的分析。

强烈推荐进行融解曲线分析,以验证 PCR 产物的特异性。融解曲线分析是定量 PCR 仪配套软件中的分析步骤。请根据仪器供应商的介绍进行操作。一般而言,应当在 65°C~95°C 之间获取融解曲线数据。引物二聚体的形成与引物设计及模板的拷贝数有关。由于引物二聚体的融解温度较低,所以很容易与特异的产物区分开来。

6. 可选:加入数据获取步骤后重复以前的循环。

为了消除由引物二聚体造成的荧光读数,可以在循环操作中加入数据获取步骤(见步骤 3)。温度设置应当高于引物二聚体的 T_m 值,但比特异性产物的 T_m 值大约低 3°C。在引物二聚体被同时扩增的情况下,这一方法可以提高检测的动态范围并提高定量的可信度。

7. 可选:利用琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物的特异性。

【注意事项】

1. 为了节约试剂,建议先用普通 PCR 优化好各种反应条件。
2. 为了保证反应效率,使用 SmartGreen 进行荧光定量 PCR 时,扩增片段长度最好在 50~600bp。
3. 如果使用罗氏 LightCycler,则需添加 BSA。
4. SmartGreen 可以造成眼睛、皮肤及呼吸道的损伤,使用时请注意防护,最好佩带防护眼镜及手套。
5. 为了确保实验结果的可靠性,每次实验均应设置阴阳性对照。
6. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品等用途。

北京美莱博医学科技有限公司

北京市海淀区信息路 1 号上地国际科技创业园 1#-804
电话:86-10-82893546-801 传真:86-10-82894339-806
邮编:100085 Email: mylab_sales@163.com
<http://www.mylab.com.cn>

MyLab® 20xSmartGreen

(荧光定量 PCR 专用染料)

使用说明书



北京美莱博医学科技有限公司

2007 年 3 月

【规格】0.5ml/管。

【特点】

该产品可用作 real-time PCR 定量专用荧光指示剂。用于在任何一台 real-time PCR 仪上进行 PCR 反应。可兼容原有的 SYBR Green I 或 FAM 的设置。但是由于仪器的不同以及 SYBR Green I 波长不同, Ct 值会有微小的差别(±1)。然而, 不论使用任何一台 PCR 仪, SmartGreen 荧光信号均强于 SYBR GREEN I。一般使用时将其稀释至 1×浓度。为了得到更高的荧光信号强度, 根据所使用的聚合酶对其耐受程度的不同, 可以选择性的提高 SmartGreen 的浓度 4 倍至 5 倍。

SmartGreen 具有极高的灵敏度, 在推荐浓度下使用时可以获得最强的 PCR 扩增信号, 同时, 背景荧光很低。它 PCR 抑制性极小, 同时十分稳定, 在大部分生化条件下非常稳定, 可在室温下储存并可反复冻融, 而 SYBR Green I 不稳定而且降解后对 PCR 抑制性更强。SmartGreen 具有优越的兼容性。和 SYBR Green I 光谱相似, 和各品牌的 qPCR 仪器兼容, 替代 SYBR Green I, 毋须改变任何您目前使用的操作步骤/仪器设备。

【保存条件】-20℃避光保存,

【有效期】>12 个月。

【适用范围】单个基因的 PCR 扩增及其荧光定量检测。

【使用方法】

只需在 PCR 体系中, 加入 SmartGreen 至终浓度为 1× 即可进行反应。反应中实时采集荧光信号, PCR 反应完成后, 进行熔解曲线分析。

【反应举例】

注意: 以下举例多数情况下可参考。实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异, 需根据实际情况, 设定最加反应条件。

用 Mylab 2× PCR TaqMix 产品, 以人基因组 DNA 为模板, 扩增 0.5kb 的片段, 反应体系为 50μl。如反应体系不同, 可按此比例增加/减少用量。

1. 将 2×PCR TaqMix、SmartGreen、模板 DNA、引物以及去离子水在室温融化后混匀。
2. 准备 PCR 反应混合物。冰浴中按下面的量加入各种反应物, 混匀:

2×PCR SmartMix	25μl
20×SmartGreen	2.5μl
Primer 1 (10μM)	2.5μl
Primer 2 (10μM)	2.5μl
Template	<0.5μg
ddH ₂ O	补至 50μl

3. 按照下表所示, 设置 PCR 扩增程序。

步骤	时间	温度	说明
PCR 起始步骤	5 min	95°C	预变性
3 步或 4 步循环			
变 性	15 sec	94°C	
退 火 (温度可调)	30 sec	50-60°C	比引物的 T _m 值大约低 5~8°C。
延 伸	30 sec	72°C	如果未加入附加的数据获取步骤, 则在这一步获取荧光数据。
可选: 数据获取	15 sec	D °C	引物 T _m < D < 产物 T _m
循环数	35~40 个循环		循环数与模板 DNA 的量相关

首次扩增某一模板时, 一般先在延伸步骤采集数据, PCR 反应完成后, 进行融解曲线分析 (见步骤 5)。以后扩增相同的模板时, 可以根据融解曲线分析结果加入数据采集步骤 (详见步骤 6), 以便获得更准确的定量结果。