



Lyo-easy® SYBR Master Mix

Cat. No. CW3364

保存条件： 常温保存

运输条件： 常温运输

常温条件下可保存12个月，如需更长时间，可置于2-8℃条件下保存24个月。储存时保证铝箔袋处于真空状态。本产品打开八联排/冻存管盖和玻璃瓶瓶盖后，应在1h内使用无核酸酶水进行复溶（具体操作见使用说明）。复溶后为PCR预混液，可在-20℃储存3个月，4℃储存2周。

产品内容

Component	CW3364T	CW3364S	CW3364M
Lyo-easy® SYBR Master Mix	24 rxns	48 rxns	100 rxns

产品简介

Lyo-easy® SYBR Master Mix产品以冻干形式提供，是一种SYBR GreenI嵌合荧光法进行qPCR反应的专用混合物，使用前可在室温下运输和储存。此混合物包含除引物、DNA/cDNA样本外PCR扩增所需的所有组分，使用时只需加无核酸酶水复溶即可，具有特异性强、检测灵敏度高、扩增产量高等诸多优点。适合对DNA、cDNA样本进行定量、定性分析，可在多达6个对数级的动态范围内进行准确检测。此混合物中含有 ROX Reference Dye，可兼容多种qPCR仪器。

使用说明

复溶

使用时，取下八联排/冻存管管盖和玻璃瓶瓶盖，每反应加入10 μL 无核酸酶水(推荐使用CW0612)；八联排每管加入10 μL 无核酸酶水进行复溶，冻存管每管加入270 μL 无核酸酶水进行复溶，玻璃瓶每瓶加入1100 μL 无核酸酶水进行复溶。复溶之后通过移液枪轻轻吹打或轻轻涡旋混合均匀，复溶后即为2 \times 预混液。

PCR反应体系

1. 如上所述对Lyo-easy[®] SYBR Master Mix冻干试剂进行复溶后，可直接进行体系配置。如果使用已经复溶后的预混液，-20 $^{\circ}\text{C}$ 取出置于室温完全解冻，经过短暂混匀和离心后进行体系配置。
2. 根据下表，确定适当反应次数的总体积，制备除DNA/cDNA模板以外的所有组分的PCR混合物。

组分	20 μL 体系	终浓度
Lyo-easy [®] SYBR Master Mix (2 \times 预混液)	10 μL	1 \times
Forward Primer, 10 μM	0.4 μL	0.2 μM
Reverse Primer, 10 μM	0.4 μL	0.2 μM
Template DNA	X μL	<1 μg (total DNA)
无核酸酶水	Up to 20 μL	

注意：若选用CW3364S八联排冻干产品，可直接添加引物、模板。

3. 反应体系配置完成后，移液枪轻轻吹打混匀或者瞬时涡旋混匀，通过短暂离心后将液体收集到管底。
4. 反应体系配置过程中或配置完成后进行等体积分样至qPCR管/96孔板时，为得到最佳的实验结果，操作过程中需保证移液体积基本一致，最大限度的减少气泡产生。
5. 将DNA/cDNA模板添加到qPCR管/96孔板中时，使用透光率好无破损的透明盖密封，使用荧光定量PCR透明封板膜，特别注意密封盖盖紧和密封板的边缘角落确保完全密封，以防止蒸发造成气溶胶污染。
6. 上机前需将qPCR管/96孔板（在2500-3000 rpm下1 min）瞬时离心，去除气泡的同时将液体全部收集至底部。

PCR反应程序

使用荧光定量仪器上的SYBR®Green Reagents “全通道扫描”模式设置。

为更快地获得实验结果，可以根据仪器实际情况使用“Fast”快速程序（例如：Applied Biosystems StepOnePlus、QuantStudio、7500 等快速程序仪器）。

步骤	温度	时间	循环数
预变性 ¹⁾	95°C	5-30 s	1
变性 ²⁾	95°C	5-15 s	} 40-45 cycles
退火/延伸 ³⁾	60°C	10-30 s *	
	95°C	15 s	
熔解曲线 ⁴⁾	60°C	1 min *	
	95°C	1 s	

注意：

- 1) 预变性条件适合绝大多数扩增反应，标准程序选择30 s，快速程序最短可选5 s。如模板结构复杂，可将预变性时间延长至3 min以提高预变性效果。
- 2) 变性：标准程序选择10 s；快速程序最短可选5 s。
- 3) 退火/延伸：标准程序选择30 s；快速程序：对于200 bp以内的扩增产子，延伸时间最短可设为10 s；超过200 bp时，推荐延伸时间为30 s。
- 4) 熔解曲线分析请以所使用的荧光定量PCR仪推荐的程序进行设定，本程序是以ABI-Q5荧光定量PCR仪为参照设定。
- 5) *标注处设置信号采集。

结果分析

1. 有关实时荧光定量PCR仪器数据分析的基本信息，请参阅相应仪器的用户手册。
2. 运行完成后，检查扩增曲线，确保基线阈值设置在PCR指数相对应的区间内且高于任何背景信号。
3. 扩增曲线：标准扩增曲线为S型。
 - (1) Ct值落在20-30之间时，定量分析最准确；
 - (2) Ct值小于10，需要将模板稀释后，重新进行实验；
 - (3) Ct值介于30-35之间时，需要提高模板浓度，或者增大反应体系的体积，以提高扩增效率，保证结果分析的准确性；
 - (4) Ct值大于35时，检测结果无法定量分析基因的表达式，但可用于定性分析。

4. 熔解曲线:

- (1) 熔解曲线单峰, 表明反应特异性好可以进行定量结果分析; 若熔解曲线出现双峰或者多峰, 则不能进行定量分析。
- (2) 熔解曲线出现双峰, 需判断非目标峰是引物二聚体还是非特异性扩增。如果是引物二聚体, 建议降低引物浓度, 或重新设计扩增效率高的引物。如果是非特异性扩增, 请提高退火温度, 或者重新设计更高特异性的引物。

引物设计指南

1. 推荐引物长度25 bp左右。扩增产物长度150 bp为佳, 可以在100 bp-300 bp内选择。
2. 正向引物和反向引物的T_m值相差不宜超过2°C。引物T_m值56°C-65°C为佳。
3. 引物碱基分布要均匀, 避免出现连续的4个相同碱基, GC含量控制在50%左右。3'端最后一个碱基最好为G或C。
4. 引物内部或者正反两条引物间最好避免出现有3个碱基以上的互补序列。
5. 引物特异性需要用NCBI BLAST程序进行核对。避免引物3'端有2个碱基以上的非特异性互补。
6. 设计完成的引物需要进行扩增效率的检测, 只有具备相同扩增效率的引物才可用于定量比较分析。

相关产品

Cat. No.	产品名称
CWY129	磁珠法血液DNA提取试剂盒
CW2298	通用型柱式基因组DNA提取试剂盒
CW0531	新型植物基因组DNA提取试剂盒 (适用多糖多酚)
CWY036	一次性使用游离DNA保存管 (玻璃, 10 mL)
CWY041	一次性使用粪便采集保存管
CW3371	HiFiScript All-in-one RT MasterMix for qPCR
CW0612	RNase-Free Water