Version：AH 4.0（2024.10.24修订）

2×SYBR Green qPCR Mix

（With ROX）

目录号：AH0104

01/产品组分

序号	组分	AH0104-A 125 rxn （20 μL/rxn）	AH0104-B 500 rxn （20 μL/rxn）	AH0104-C 500 rxn（20 μL/rxn）×5
1	2×SYBR qPCR Mix	1.25 mL	1.25 mL×4	AH0104-B×5
2	ROX Reference Dye I*	50 μL	200 μL	
3	ROX Reference Dye II*	50 μL	200 μL	
4	RNase Free H_2O	1.25 mL	1.25 mL×4	

*ROX Reference Dye 用于校正孔与孔之间的荧光信号误差。不同机型使用情况参见下表：

ROX Reference Dye I	ABI 5700/7000/7300/7700/7900/7900 HT/7900 HT Fast，ABI Step One，ABI Step One Plus
ROX Reference Dye II	ABI 7500，7500 Fast，ViiA™7，Quant Studio 3/5/ 6 Flex/7 Flex/12k Flex，Stratagene MX4000，MX3005P，MX3000P
不需要 ROX Reference Dye	Bio-Rad iQ5/Chromo4/iCycler iQ/CFX96/CFX384/Opticon/Opticon 2/MyiQ/MiniOpticon，Eppendorf realplex 2s/Mastercycler ep realplex，Qiagen Rotor-Gene Q/Rotor-Gene 3000/Rotor-Gene 6000，Roche LightCycler 2.0/LightCycler 96/ LightCycler 480

02/保存条件

本产品 2×SYBR qPCR Mix、ROX Reference Dye I、ROX Reference Dye II 于-20 ℃避光保存。

03/产品概述

本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。本产品将热启动 HotMaster Taq DNA 聚合酶、dNTP、特殊稳定剂、优化的反应缓冲液和 SYBR Green I 等试剂预混成一种适合 Real Time PCR 反应检测用的 2×浓度的试剂，具有灵敏度高、特异性强、扩增效率高、稳定性好等特点。使用时只需加入模板、引物和水，便可在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对目的基因进行准确定量，检测结果重复性好，可信度高。

本品采用新型抗体修饰的 HotMaster Taq DNA 聚合酶，该聚合酶利用抑制剂通过温度调节方式封闭 HotMaster Taq DNA 聚合酶

的底物结合位点，无需额外加热即可进行反应，最大限度的减少了 PCR 扩增过程中非特异性扩增产物的产生，大大提高了荧光定量 PCR 反应的精确性。

04/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

◇ 本制品含独立包装参比染料 ROX，客户可根据 qPCR 仪器技术指导决定是否需要加 ROX 和加入浓度，用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

◇ 本制品含 SYBR Green I，强光下易分解，降低敏感度，使用时应避免强光照射。

◇ 建议 PCR 反应液在冰上配制，可以提高扩增特异性，减少背景。

◇ 请冰上融化后，轻轻上下颠倒，混合均匀，避免起泡，并瞬时离心后使用。

◇ 扩增产物长度建议不要超过 300 bp。

◇ 20 μL 体系中 cDNA 的加入量（相当于总 RNA 的量）建议 10 pg-100 ng；基因组 DNA 的加入量建议 10-100 ng；质粒的加入量建议不低于 10 拷贝。

05/PCR 实验流程（以不同机型举例，选择本实验室机型程序即可）

需要 ROX Reference Dye II 校准的操作方法，以 ABI 7500 为例；以 10 μL，20 μL 反应体系为例，其他体系可以按照表格 Final Concentration 所示比例进行调整配制：

1. 配制 PCR 反应液：

Components	Volume（10 μL）	Volume（20 μL）	Final Concentration
2×SYBR qPCR Mix	5 μL	10 μL	1×
DNA/cDNA*	X μL	X μL	as required
Forward Primer（10 μM）	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
Reverse Primer（10 μM）	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
ROX Reference Dye II	0.2 μL	0.4 μL	as required
RNase Free H_2O	up to 10 μL	up to 20 μL	

* 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的1/10。

2. 设置 PCR 反应程序：

PCR 循环（二步法）

94 ℃： 2-3 min

94 ℃： 5-10 sec ┐

60 ℃： 34 sec*1 ┘ 40 cycles

Dissociation Stage*3

PCR 循环（三步法）

94 ℃： 2-3 min

94 ℃： 10-20 sec ┐

55-60 ℃*2： 10-20 sec ┤ 40 cycles

72 ℃： 20-30 sec ┘

Dissociation Stage*3

***1** 延伸时间请根据使用的机型所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用 ABI 7500 时至少34 sec；

***2** 依据所研究的目的基因引物的 TM 设置最适退火温度。

***3** 使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

需要 ROX Reference Dye I 校准的操作方法，以 ABI Step One Plus 为例；以 10 μL，20 μL 反应体系为例，其他体系可以按照表格 Final Concentration 所示比例进行调整配制：

1. 配制 PCR 反应液：

Components	Volume（10 μL）	Volume（20 μL）	Final Concentration
2×SYBR qPCR Mix	5 μL	10 μL	1×
DNA/cDNA*	X μL	X μL	as required
Forward Primer（10 μM）	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
Reverse Primer（10 μM）	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
ROX Reference Dye I	0.2 μL	0.4 μL	as required
RNase Free H_2O	up to 10 μL	up to 20 μL	

* 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的1/10。

2. 设置 PCR 反应程序：

PCR 循环（二步法）

94 ℃： 2-3 min

94 ℃： 5-10 sec
60 ℃： 30 sec*1 } 40 cycles

Dissociation Stage*3

PCR 循环（三步法）

94 ℃： 2-3 min

94 ℃： 10-20 sec
55-60 ℃*2： 10-20 sec
72 ℃： 20-30 sec } 40 cycles

Dissociation Stage*3

***1** 延伸时间请根据使用的机型所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用 ABI 7700和7900 HT 时至少30 sec；使用 ABI 7000和7300时至少31 sec；使用 ABI Step One Plus 时至少10 sec。

***2** 依据所研究的目的基因引物的 TM 设置最适退火温度。

***3** 使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

不需要 ROX Reference Dye 校准的操作方法，以 Roche LightCycler 480为例；以10 μL，20 μL反应体系为例，其他体系可以按照表格 Final Concentration 所示比例进行调整配制：

1. 配制 PCR 反应液：

Components	Volume（10 μL）	Volume（20 μL）	Final Concentration
2×SYBR qPCR Mix	5 μL	10 μL	1×
DNA/cDNA*	X μL	X μL	as required
Forward Primer（10 μM）	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
Reverse Primer（10 μM）	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
RNase Free H_2O	up to 10 μL	up to 20 μL	

* 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的1/10。

2. 设置 PCR 反应程序：

PCR 循环（二步法）			PCR 循环（三步法）		
94 ℃：	2-3 min		94 ℃：	2-3 min	
94 ℃：	5-10 sec	40 cycles	94 ℃：	10-20 sec	40 cycles
60 ℃：	30 sec*1		55-60 ℃*2：	10-20 sec	
Dissociation Stage*3			72 ℃：	20-30 sec	
			Dissociation Stage*3		

***1** 延伸时间请根据使用的机型所需要的数据采集最短时间限制自行调整。

***2** 依据所研究的目的基因引物的 TM 设置最适退火温度。

***3** 使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

06/相关产品

AC0101 SparkZol Reagent

AC0202 SPARKeasy 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒（含基因组 DNA 清除柱）

AC0205 SPARKeasy 细胞 RNA 快速提取试剂盒

AC1709 RNase Free and DNase Free 纯水

AG0304 SPARKscript II RT Plus Kit（With gDNA Eraser）

AG0305 SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR（With gDNA Eraser）

AG0501 SPARKScript miRNA 1st strand cDNA synthesis kit（Tailing Reaction）

AG0502 SPARKScript II miRNA 1st strand cDNA synthesis kit（By stem-loop）