

PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix 简要操作说明

货号：A46012，A46109，A46110，A46111，A46112，A46113

本操作说明提供了 PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix 的简要操作指南。更详细信
息，请至赛默飞世尔官方网站下载英文版说明书：https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0018825_PowerTrackSYBRGreenMasterMix_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUG93ZXJUCmFjayBTWUJSIEdyZWVuIE1hc3RlciBNaXg=

https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0018825_PowerTrackSYBRGreenMasterMix_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUG93ZXJUCmFjayBTWUJSIEdyZWVuIE1hc3RlciBNaXg=

货号	包装规格		保存条件
	Master mix	Yellow Sample Buffer	
A46012	1 mL	1.25 mL	Master mix 和 Yellow Sample Buffer 的保存条件为-25°C to -15°C。 Yellow Sample Buffer 可在 2-8°C保存一年。
A46109	5 mL	1.25 mL	
A46110	2×5 mL	2×1.25 mL	
A46111	5×5 mL	5×1.25 mL	
A46112	10×5 mL	10×1.25 mL	
A46113	50 mL	4×1.25 mL	

一 . 总体实验要求

- 建议每个反应孔使用 1-10 ng cDNA 或 10-100 ng gDNA。
- 每个样本推荐进行四次重复。
- 基于实验需求配置反应预混液，根据所需反应数按比例加入各组分，请为各组分预留 10%的余量，以免移液损失。
- 如果要减小反应体系，请将各组分按比例缩减。不推荐小于 10 μL 的反应体系。

- 对于 $T_m=55^{\circ}\text{C}$ 的引物，推荐反应终浓度各为 400 nM。
- 建议设置无模板对照 (NTC)，可以帮助鉴定 PCR 反应中是否有污染。NTC 中包括除模板以外的所有 qPCR 反应成分。

二 . 准备试剂

- 解冻预混液，解冻完成后，涡旋充分混匀。
- 将 DNA 样品和引物在冰上解冻，涡旋混匀，然后短暂离心。
- 在使用之前，涡旋 Yellow Sample Buffer。

三 . 配置 PCR 反应体系

- **注意：Yellow Sample Buffer 的加入是可选的。**
 - Yellow Sample Buffer 浓度为 40 \times 。它是加在 DNA 样本中的，在 PCR 反应体系中的终浓度为 1 \times 。建议 DNA 模板的体积为最终 PCR 反应体系体积的 10%-20%。
1. (可选) 将 Yellow Sample Buffer (40 \times) 加入到 DNA 样本中，注意根据 PCR 反应体积加入相应量的 Yellow Sample Buffer (40 \times)，配置体系如下：

最终 PCR 反应体积	Yellow Sample Buffer (40 \times) 加入体积
20 μL	0.5 μL
10 μL	0.25 μL

确保 Yellow Sample Buffer 在 PCR 反应体系中的终浓度为 1 \times 。

2. (可选) 将配置好的 DNA 和 Yellow Sample Buffer 涡旋，然后离心。
3. 按照下表将 PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix，引物和无酶水进行混合。
4. 将第 2 步以及第 3 步配好的溶液进行混合。

注意：如果反应体系中不加 Yellow Sample Buffer，添加无酶水将反应体系补足。

表 1 20 μL 反应体系

组成成分	试剂使用浓度	终浓度	1 个反应 所需体积	4 个反应所需体积 (含 10% 余量) ^[1]
Yellow Sample Buffer 和 DNA (步骤 1)				
DNA 模板 ^[2]	5 ng/ μL	0.5 ng/ μL	2 μL ^[3]	8.8 μL
Yellow Sample Buffer	40 \times	1 \times	0.5 μL	2.2 μL
PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix，引物和无酶水 (步骤 3)				
PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix	2 \times	1 \times	10 μL	44 μL
正向和反向引物 ^[4]	8,000 nM	400 nM	1 μL	4.4 μL
无酶水	—	—	6.5 μL	28.6 μL
总 PCR 体积	—	—	20 μL	88 μL

[1] 避免移液损失，建议为各组分预留 10% 的余量。

[2] 建议每个反应孔使用 1-10 ng cDNA 或 10-100 ng gDNA。

[3] 不要超过 8.5 μL 。

[4] 建议正、反向引物的终浓度各为 300-800 nM；对于 $T_m=55^\circ\text{C}$ 的引物，推荐终浓度为 400 nM。

表 2 10 μ L 反应体系

组成成分	试剂使用浓度	终浓度	1 个反应所需体积	4 个反应所需体积 (含 10% 余量) ^[1]
Yellow Sample Buffer 和 DNA (步骤 1)				
DNA 模板 ^[2]	5 ng/ μ L	0.5 ng/ μ L	1 μ L ^[3]	4.4 μ L
Yellow Sample Buffer	40 \times	1 \times	0.25 μ L	1.1 μ L
PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix , 引物和无酶水 (步骤 3)				
PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix	2 \times	1 \times	5 μ L	22 μ L
正向和反向引物 ^[4]	8,000 nM	400 nM	0.5 μ L	2.2 μ L
无酶水	—	—	3.25 μ L	14.3 μ L
总 PCR 体积	—	—	10 μ L	44 μ L

[1] 以免移液损失，建议为各组分预留 10% 的余量。

[2] 建议每个反应孔使用 1-10 ng cDNA 或 10-100 ng gDNA。

[3] 不要超过 4.25 μ L。

[4] 建议正、反向引物的终浓度各为 300-800 nM；对于 $T_m=55^\circ\text{C}$ 的引物，推荐终浓度为 400 nM。

注意：由于加入到 DNA 中的 Yellow Sample Buffer 和 PowerTrack™ SYBR™ Green Master Mix 的惰性蓝色染料发生了反应，整个 PCR 反应混合液会变成绿色。

5. 将各组分充分混匀，然后离心。

6. 将反应液分装到每个反应孔中。封上贴膜，离心，避免产生气泡。

注意：在室温避光条件下，制备好的 qPCR 反应板可以保存 8 小时。

四．设置和运行 qPCR 反应程序

1. 根据需要选择快速或标准 PCR 反应程序，并按照以下表格设置反应参数。（注：如果反应模板是 gDNA 或者是长片段扩增子，推荐使用标准反应程序。）

Table 3 快速反应程序

阶段	温度	时间	循环
酶激活	95°C	2 分钟	1
变性	95°C	5 秒	40
退火/延伸	60°C	30 秒	

Table 4 标准反应程序

阶段	温度	时间	循环
酶激活	95°C	2 分钟	1
变性	95°C	15 秒	40
退火/延伸	60°C	1 分钟	

2. 根据下列表格设置熔解曲线条件。

Table 5 快速反应程序

阶段	升降温速率 ^[1]	温度	时间
1	1.99°C/秒	95°C	15 秒
2	1.77°C/秒	60°C	1 分钟
3 ^[2]	0.075°C/秒	95°C	15 秒

[1] StepOnePlus™ 仪器使用默认的升降温速率。

[2] 荧光采集步骤

Table 6 标准反应程序

阶段	升降温速率 ^[1]	温度	时间
1	1.6°C/秒	95°C	15 秒
2	1.6°C/秒	60°C	1 分钟
3 ^[2]	0.075°C/秒	95°C	15 秒

[1] StepOnePlus™ 仪器使用默认的升降温速率。

[2] 荧光采集步骤

注意：qPCR 反应程序结束后，必须立即进行熔解曲线的检测。

3. 在 ABI 品牌荧光定量 PCR 仪上按照如下设置：

反应类型：标准曲线

试剂：SYBR Green 试剂

报告基团：SYBR

淬灭基团：None

参比荧光染料：ROX

运行模式：标准模式或快速模式

熔解曲线模式：除了 StepOnePlus，其他仪器都选择 Continuous；只有 StepOnePlus 选择 step and hold 模式。

4. 设置反应体积，将反应板放在荧光定量 PCR 仪上，开始运行实验。

五．实验数据分析

1. 观察扩增曲线。

2. 设置合适的基线和阈值。

3. 观察熔解曲线，检查反应体系中是否存在非特异性扩增或引物二聚体。
4. 进行相对定量或绝对定量的计算。



Applied Biosystems

技术支持服务中心

800-820-8982

400-820-8982

© 2017 Thermo Fisher Scientific Inc.

ThermoFisher
S C I E N T I F I C

出版编号 MAN0026534 修订版 A