

BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (含示踪染料)

产品编号	产品名称	包装
D7601S	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (含示踪染料)	100次
D7601M	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (含示踪染料)	500次
D7601L	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (含示踪染料)	2500次

产品简介:

- 碧云天的BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (含示踪染料), 即BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix with Tracking Dyes, 是一种用于实时荧光定量PCR, 即qPCR (Quantitative PCR)或Real-time PCR, 含双染料示踪系统(with a dual-dye tracking system)的高品质预混液, 可利用两种示踪染料混合后产生的变色效应追踪移液过程, 方便用户分辨空白孔和加入qPCR Mix的孔, 并确认体积较少的DNA样品是否已经添加到qPCR Mix中, 可快速便捷的用于cDNA或基因组DNA等的特异性超高灵敏度定量检测。
- 在进行qPCR反应体系的溶液配制时, 由于DNA样品加入的体积通常只有1-2微升左右, 很难通过肉眼分辨是否已经加入了样品。本产品中的BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Blue)中添加有示踪作用的惰性蓝色染料, 同时提供具有惰性黄色染料的模板稀释液Template Dilution Buffer (40X, Yellow), 在配制qPCR反应体系时, 随着两个组分的混合, 溶液颜色会产生显著变化, 即当黄色溶液加入到蓝色溶液中后, 变成绿色溶液, 从而可以根据液体颜色变化准确判断是否已加入DNA模板和qPCR mix, 这就在加样过程中起到示踪作用, 提高qPCR体系设置的正确率, 避免漏加或错加模板等[1]。
- 本产品中的BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Blue)使用SYBR Green I作为荧光染料, 经反复验证, 添加的蓝色和黄色两种惰性示踪染料的光谱与SYBR Green I不重叠, 不会影响荧光定量检测, 也不影响扩增体系的酶活性(图1)。SYBR Green I是一种结合于双链DNA (Double-strand DNA, dsDNA)双螺旋小沟区域的绿色荧光染料。SYBR Green I在游离状态下的荧光比较微弱, 一旦与双链DNA结合后, 其荧光会大大增强。通过检测荧光强弱就可以定量检测PCR过程中扩增产生的双链DNA的数量。

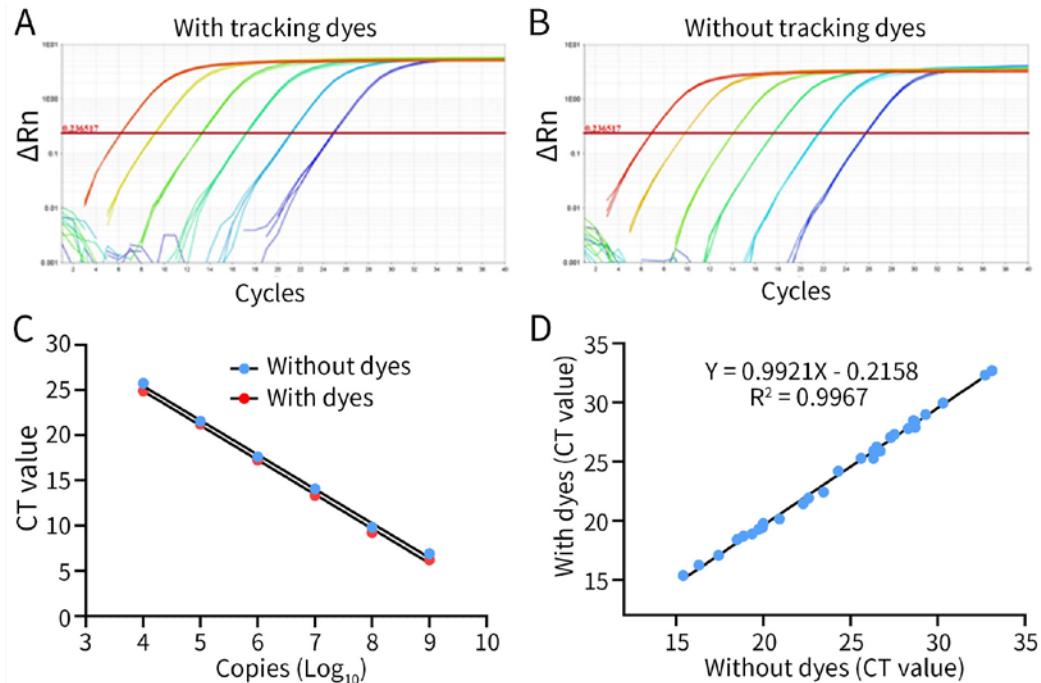


图1. 碧云天BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (含示踪染料) (D7601)与BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Low ROX) (D7262)的扩增效果对比图。如图A-C所示, 将初始浓度为10ng/ μ l的标准品质粒进行6个10倍梯度稀释, 分别使用添加双重示踪染料的本产品(With tracking dyes)和未添加示踪染料的BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Low ROX) (D7262) (Without tracking dyes)进行扩增检测。图A、图B分别为本产品 and D7262的扩增曲线图; 图C为根据图A和图B扩增曲线的CT值绘制的标准曲线, 横坐标为稀释后的样品经计算后的拷贝数的对数(\log_{10}), 纵坐标为对应的CT值; 图D为分别使用添加双染料示踪指示剂的本产品和D7262对30个基因进行扩增, 横、纵坐标分别为D7262和本产品扩增不同基因的CT值, 结果显示两个产品使用效果基本一致。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本产品中的BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Blue)中使用的BeyoFast™ Taq DNA Polymerase是一种与抗体结合的高品质热启动酶，能够实现便捷高效的热启动。BeyoFast™ Taq DNA Polymerase中的Taq酶与抗Taq酶的单克隆抗体相互结合，从而抑制了Taq酶的DNA聚合酶活性，这样可以有效避免在低温条件下由引物和模板DNA非特异性退火或引物二聚体引起的非特异性扩增。在PCR反应的预变性步骤中抗体会被加热失活，这样可以确保仅在预变性后才会把Taq酶的活性释放出来，预变性之前不会发生DNA聚合反应，从而大大提高了PCR反应的特异性、灵敏度和定量检测的准确性[2,3]。
- 本产品中的BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Blue)包含了BeyoFast™ Taq DNA Polymerase、蓝色示踪染料、PCR Buffer、dNTPs、SYBR Green I荧光染料、稳定剂和镁离子等所有的通用组分，使操作更简单、使用更便捷。用户只需自备引物、样品DNA和去离子水即可。
- 本产品提供了Low ROX和High ROX，广泛兼容于无需ROX和需要Low ROX或High ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪。ROX的作用是用于校正与PCR无关的荧光波动，从而最大限度减少孔间差异。这种差异可能由多种因素引起，如移液误差及样品蒸发等。不同的荧光定量PCR仪对ROX的要求不同，请根据实际所用仪器在配制反应体系时选择高浓度ROX (High ROX)、低浓度ROX (Low ROX)或不加ROX。通常含高浓度ROX的BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (含示踪染料)也可以用于不需要ROX或需要低浓度ROX的荧光定量PCR仪。常用仪器所需ROX类型请参考如下表格。

添加ROX类型	适用PCR仪
不需添加	Bio-Rad: CFX384, CFX96, .MiniOpticon, iCycler IQ, MyiQ and iQ5; Eppendorf: Mastercycler ep realplex and realplex2 s; Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 6000; Roche: LightCycler 480; Cepheid: SmartCycler; Illumina: Eco qPCR
Low ROX	ABI: 7500(Fast), ViiA 7, QuantStudio 6 and 7 Flex Systems; Stratagene: Mx3000P, Mx3005P and Mx4000; Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 3000; Bio-Rad/MJ: Chromo4, Opticon 2 and Opticon;
High ROX	ABI GeneAmp 5700; ABI PRISM 7000, 7700; ABI 7300, 7900HT(Fast); ABI StepOne(Plus)

- 本产品稳定性好，在37°C条件下保存3天不影响产品扩增效果(图2)。

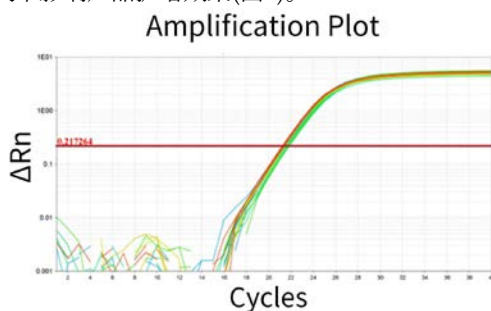


图2. 碧云天BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (含示踪染料) (D7601)的稳定性检测效果图。将37°C保存3天与-20°C正常保存的本产品用于相同模板的扩增对比分析，结果显示以上两种储存条件下qPCR产物CT值基本无差异。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- 相对于同类产品(Competitor)，本产品颜色差异更显著、扩增性能更灵敏(图3)。

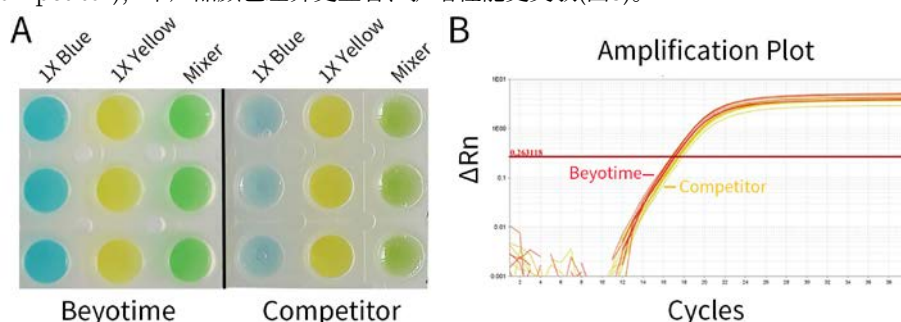


图3. 碧云天BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (含示踪染料)系列产品与国内同类产品(Competitor)的颜色差异与检测效果对比图。图A为本产品与同类产品稀释至1X时的外观颜色对比分析，第一列与第四列的蓝色孔(1X Blue)为稀释至1X的含蓝色示踪染料的SYBR Green qPCR Mix，第二列与第五列的黄色孔(1X Yellow)为稀释至1X的含黄色示踪染料的Template Dilution Buffer，第三列与第六列的绿色孔(Mixer)为稀释至1X的含蓝色示踪染料的SYBR Green qPCR Mix与含黄色示踪染料的DNA模板的混合物。经对比，本产品的颜色差异更显著，示踪效果更明显。图B为本产品与同类产品对标准品质粒的qPCR检测扩增曲线对比分析，相对于同类产品，本产品扩增的CT值略低，检测效果略更灵敏。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- 本产品如果用于常规的96孔板qPCR检测(建议反应体系为20μl)，小包装可以进行100次检测，中包装可以进行500次检测，大包装可以进行2500次检测；如果用于常规的384孔板qPCR检测(建议反应体系为10μl)，小包装可以进行200次检测，中包装可以进

行1000次检测，大包装可以进行5000次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D7601S-1	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Blue)	1ml
D7601S-2	Template Dilution Buffer (40X, Yellow)	0.2ml
D7601S-3	Low ROX (50X)	40µl
D7601S-4	High ROX (50X)	40µl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7601M-1	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Blue)	1ml×5
D7601M-2	Template Dilution Buffer (40X, Yellow)	1ml
D7601M-3	Low ROX (50X)	0.2ml
D7601M-4	High ROX (50X)	0.2ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7601L-1	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Blue)	1ml×25
D7601L-2	Template Dilution Buffer (40X, Yellow)	5ml
D7601L-3	Low ROX (50X)	1ml
D7601L-4	High ROX (50X)	1ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20℃避光保存，一年有效；4℃避光保存，一个月内有效。尽量避免反复冻融。

注意事项：

- 使用前需确保本产品完全融化，上下颠倒轻轻混匀后使用。混匀过程中尽量避免产生气泡。
- 注意引物退火温度，当退火温度<60℃时，推荐使用三步法PCR扩增。
- BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Blue)中含有SYBR Green I荧光染料，保存本产品或设置PCR反应时应避免强光照射，以尽量避免荧光淬灭问题。
- 对于超过350bp或者高GC含量的扩增片段，建议增加延伸时间至60秒或者采用三步法以提高扩增效率。
- 经测试，本产品反复冻融10次对使用效果无显著影响。但仍需尽量避免反复冻融本产品，反复冻融可能使产品性能下降。
- qPCR检测是超高灵敏度的检测，PCR反应设置区域需尽量避免各种可能的待扩增产物的污染。PCR产物宜密封后丢弃，以避免超高浓度的PCR产物污染实验环境。若反应体系存在扩增产物污染，推荐使用防污染型qPCR Mix。
- 建议进行熔解曲线(Melt curve)分析以确定扩增反应的特异性。如果只有一个熔解曲线峰(对应的退火温度即双链DNA产物的T_m值)，说明只有一种单一产物；如果熔解曲线出现双峰、多峰或杂峰峰，可能是引物二聚体或非特异性扩增、存在基因组DNA污染、试剂及环境被污染等。建议设置不含模板的对照(No template control, NTC)，即反应体系中包含除模板以外的所有反应组分，根据样品孔和无模板对照孔熔解曲线的差异，可判断是否存在引物二聚体或其它的非特异性扩增。
- 超纯水推荐选购碧云天生产的BeyoPure™ Ultrapure Water (PCR级, Sterile) (ST873)。
- qPCR的内参引物和目的基因引物推荐选购碧云天预先设计、经过qPCR验证、预混的引物对产品。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. PCR反应体系的设置：

- 融解并混匀PCR反应所需的各种溶液。将所有试剂完全融解并混匀后置于冰浴上或冰盒内。
- 模板稀释(可选)：如不需要进行模板的示踪，则可以不使用Template Dilution Buffer进行模板稀释即可。

本产品提供的Template Dilution Buffer (40X, Yellow)为40X，在最终的PCR反应体系中须为1X。

参考下表，以原始模板DNA (Original Template DNA)稀释至100µl (Total Template DNA)为例，根据‘稀释后的模板 (Diluted Template DNA)加入到20µl qPCR反应体系中的体积’，对应的原始模板的稀释方法可参考下表(对于20µl qPCR反应体系，通常稀释后的模板加入量为2µl或4µl，不能超过8µl)：

Volume for Diluted Template DNA in 20µl qPCR Reaction System (µl)	1	2	3	4	5	6	7	8
Template Dilution Buffer (40X, Yellow) (µl)	50	25	16.7	12.5	10	8.4	7.2	6.3

Original Template DNA (μl)	x	x	x	x	x	x	x	x
Ultrapure Water (μl)	50-x	75-x	83.5-x	87.5-x	90-x	91.6-x	92.8-x	93.7-x
Final volume (μl)	100	100	100	100	100	100	100	100
Yellow Dye Concentration	20X	10X	6.68X	5X	4X	3.36X	2.88X	2.52X

举例：如果原始模板需要加入黄色示踪染料，且计划加入到20μl qPCR反应体系中的稀释后的模板体积为2μl，则配制100μl稀释后的模板，需要25μl的Template Dilution Buffer (40X, Yellow)以及共计75μl的原始模板和超纯水，此时稀释后的模板中对应的黄色示踪染料浓度(Yellow Dye Concentration)为10X，在20μl qPCR反应体系中最终为1X。

c. 参考下表在室温或冰浴上设置PCR反应体系(以96孔板为例)：

Reagent	Volume for One PCR Reaction (20μl)
BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Blue) (μl)	10
Forward and Reverse Primer Mix (2.5μM each) (μl)	2
Template DNA (μl)	x
Without or Low/High ROX (50X) (μl)	0.4
Ultrapure Water (μl)	To 20μl

注1：通常引物的终浓度为0.2-0.5μM时可获得良好的检测效果，也可根据情况在0.1-1.0μM范围内调整引物的终浓度。

注2：通常DNA模板的量以1-10ng cDNA或10-100ng基因组DNA为参考用量。因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，如有必要，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。RT-PCR反应得到的cDNA直接作为模板时，其添加量不要超过PCR反应总体积的10%。

注3：96孔板的推荐反应体系为20μl，也可以根据实际实验需求，按比例扩大或缩小反应体系。

注4：建议设置不加模板的阴性对照组。

注5：推荐使用碧云天预先设计、经过qPCR验证、预混的引物对产品。

d. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体聚集于管底。推荐使用BeyoFuge™基础型微孔板离心机(垂直式, 2500rpm) (E6758)进行快速离心。

e. 将设置好的PCR反应管或PCR反应板置于荧光定量PCR仪上，开始定量PCR反应。

2. PCR反应程序：

在Real-time PCR反应前进行模板的预变性，通常设定为95°C 2分钟，复杂或高GC模板适当延长时间至5分钟。本产品中的BeyoFast™ Taq DNA Polymerase可以在15秒内可完成至少300bp的扩增，可以满足绝大多数的qPCR实验；对于超过350bp或者高GC含量的扩增子，建议增加延伸时间至60秒或者采用三步法以提高扩增效率。建议采用如下的PCR程序，本程序是以ABI QuantStudio™ 6 Flex荧光定量PCR仪为例：

- 预变性：95°C 2分钟；
- 变性：95°C 15秒；
- 退火/延伸：60°C 15-30秒；
- 重复步骤b和步骤c，总共40个循环；
- 熔解曲线分析(可选)：95°C 15秒，60°C 15秒，95°C 15秒；
- 使用荧光定量PCR仪提供的软件分析结果。

注：以上举例为常规qPCR反应系统，仅供参考。实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异，需根据模板、引物、目的片段的特点设定最佳反应条件，并根据比例放大或缩小反应体系。上述为两步法qPCR，如果采用三步法qPCR，只需在退火/延伸后加一步72°C 30秒，随后重复步骤b、c及增加的这一步骤共40个循环即可。

常见问题：

1. 荧光定量PCR结果不理想，出现特异性不好或扩增效率不高时，可能是由于以下原因造成：

- 引物设计不佳。请选择适当的引物设计软件进行引物设计，注意引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。也可以尝试使用有文献报道使用过的引物，或者从碧云天订购经过测试的qPCR引物。
- 待扩增片段GC含量偏高。GC含量较高的情况下PCR会变得相对比较困难，此时宜更换引物。
- PCR反应体系在室温设置时容易导致非特异性条带，但在用热启动酶时可以有效避免室温操作导致的非特异性条带的产生。但对于一些较难扩增的产物，可以尝试在冰浴上设置PCR反应体系，以进一步减少非特异性的DNA扩增。
- 退火温度不佳，需要优化。这种情况下宜更换引物。
- 待扩增片段GC含量较高或长度较长，变性不够充分。此时宜更换引物，使待扩增片段的GC含量和长度适中。
- 模板量太低，此时宜适当加大模板量。
- 模板中含有抑制PCR反应的物质，可以用适当的DNA纯化方法例如柱纯化等纯化模板DNA。

2. 反应条件优化方法：

- 引物浓度：通常引物终浓度为0.2-0.5μM时可获得良好检测效果，终浓度可以在0.1-1.0μM范围内适当调整。如果希望提高反应特异性，可降低引物浓度；如果希望提高扩增效率，可增加引物的浓度，从而优化反应体系。
- 退火温度：建议采用两步法PCR，退火温度60°C进行反应。如果希望提高反应特异性，可提高退火温度，以60-64°C作为退火温度的调整范围。在引物Tm值较低而得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法PCR扩增，三步法的退火温度请以56-64°C作为温度设置的参考范围。

- c. 延伸时间: 建议采用两步法PCR, 延伸15-30秒。对于超过350bp或者高GC含量的扩增子, 建议增加延伸时间至60秒或者采用三步法以提高扩增效率。

参考文献:

- Gill R K, Gill S S, Gelimison I, et al. J Biosci Med. 2021. 9(5): 94-119.
- Marilynn R Fairfax, Hossein Salimnia. Molecular Diagnostics. 2010. Pages 3-14.
- Cao H, Shockey JM. J Agric Food Chem. 2012. 60(50):12296-303.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7260-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X)	1/5/25ml
D7262-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Low ROX)	1/5/25ml
D7265-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, High ROX)	1/5/25ml
D7268S/M	BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit	100/500次
D7271-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X)	1/5/25ml
D7272-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, Low ROX)	1/5/25ml
D7273-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, High ROX)	1/5/25ml
D7277S/M	BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit	100/500次
D7501-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, 防污染型)	1/5/25ml
D7503-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Low ROX, 防污染型)	1/5/25ml
D7507-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, High ROX, 防污染型)	1/5/25ml
D7509S/M	BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (防污染型)	100/500次
D7512-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)	1/5/25ml
D7515-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, Low ROX, 防污染型)	1/5/25ml
D7518-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, High ROX, 防污染型)	1/5/25ml
D7523S/M/L	BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)	100/500/2500次
D7528S/M	BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit (防污染型)	100/500次
D7601S/M/L	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (含示踪染料)	100/500/2500次
D7612S/M	BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (含示踪染料)	100/500次
D7616S/M/L	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (含示踪染料)	100/500/2500次
D7629S/M	BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit (含示踪染料)	100/500次
D7633S/M/L	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (防污染型, 含示踪染料)	100/500/2500次
D7642S/M	BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (防污染型, 含示踪染料)	100/500次
D7646S/M/L	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (防污染型, 含示踪染料)	100/500/2500次
D7663S/M	BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit (防污染型, 含示踪染料)	100/500次
FSF002	荧光定量PCR用封板膜(ABI分装)	20片/包装
FSF035-20pcs	BeyoGold™ 荧光定量PCR用封板膜(压敏型)	20片/包装
FSF035-100pcs	BeyoGold™ 荧光定量PCR用封板膜(压敏型)	100片/包装
FSF039-20pcs	BeyoGold™ 荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装)	20片/包装
FSF039-100pcs	BeyoGold™ 荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装)	100片/包装
FTUB325-125pcs	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明)	125排/盒
FTUB325-1250pcs	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明)	125排/盒, 10盒/箱
FTUB326-300pcs	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明, 6条/袋)	6条/袋, 50袋/箱
FTUB326-1500pcs	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明, 6条/袋)	6条/袋, 250袋/箱
FTUB333	荧光定量PCR用96孔板(ABI原装)	20个/包装
FTUB384	荧光定量PCR用384孔板(ABI分装)	20个/包装
FTUB335-10pcs	BeyoGold™ 荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒
FTUB335-50pcs	BeyoGold™ 荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB337-10pcs	BeyoGold™ 荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒
FTUB337-50pcs	BeyoGold™ 荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB339-10pcs	BeyoGold™ 荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 高裙边, 磨砂)	10个/盒
FTUB339-50pcs	BeyoGold™ 荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 高裙边, 磨砂)	10个/盒, 5盒/箱

Version 2024.05.28