5. 进行 PCR 产物熔解曲线的分析。

强烈推荐进行熔解曲线分析，以验证 PCR 产物的特异性。熔解曲线分析是定量 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 之间获取熔解曲线数据。 引物二聚体的形成与引物设计及模板的拷贝数有关。由于引物二聚体的熔解温度较低，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 Tm 值，但比特异性产物的 Tm 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。Mix中Mg^{2+}浓度为 3mM，可根据需要自行添加。
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. 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。
4. 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。
5. 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

产品编号：QM-01/02

MyLab® *q*PCR SmartMix

2×SmartGreen PCRMix

使用说明书

北京美莱博医学科技有限公司

2007 年 3 月

【规格】1ml/管。

【特点】

本产品是非常方便的荧光定量检测试剂，以 2×qPCR Mix 的形式提供，已混合了 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、PCR Buffer、SmartGreen、稳定剂和增强剂等试剂，只需加入模板、引物即可进行定量 PCR 反应。SmartGreen 是 SYBR Green I 的升级替代产品，具有极高的灵敏度、超强稳定性、PCR 抑制性极小等优点。SmartGreen 与双链 DNA 结合，在激发光的作用下发出荧光，通过荧光强度的测定，即可确定双链 DNA 的含量。整个过程非常简单，最大限度的减少加样次数，有效避免加样误差及交叉污染。不用繁琐的条件摸索，同样可以获得精确度好、重复性高的定量 PCR 反应。

【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】

使用时只需取适量 2× qPCR SmartMix 溶液，加入引物和模板，并加入去离子水补足体积，使 qPCR SmartMix 溶液的浓度为 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 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 20μl。如反应体系不同，可按此比例增加或减少用量。

1. 将 2×qPCR SmartMix、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×qPCR SmartMix	10μl
Primer 1 (5μM)	1μl
Primer 2 (5μM)	1μl
Template	<0.2μg
ddH_2O	补至 20μl

3. 按照下表所示，设置 PCR 扩增程序。

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，进行熔解曲线分析（见步骤 5）。以后扩增相同的模板时，可以根据熔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。

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 Tm 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 Tm< D < 产物 Tm
循环数	35~40 个循环		循环数与模板 DNA 的量相关

4. 将 PCR 管放入热循环仪并启动循环程序。