

2 X Realtime SYBR qPCR Mixture (Universal)

货号: NG042S 5ml

NG042M 50ml

储存条件: -20°C 可存放 24 个月, 4°C 可存放一月。避免反复冻融

产品简介:

本产品为采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时荧光定量 PCR 的专用 2×浓度预混液, 体系中添加通用 ROX, 无需在不同的仪器上调整 ROX 浓度。产品中核心组分为 Fast HSTaq DNA Polymerase, 高温加热前, 抗 Taq 单克隆抗体与 Taq 结合, 抑制 Taq 的聚合酶活性, 从而抑制在低温条件下出现的由引物和模板 DNA 非特异性杂交或引物二聚体引起的非特异性扩增。抗体在 PCR 反应的预变性步骤中已完全失活, 不会阻碍之后 Taq 酶聚合反应, 大大提高了 PCR 反应的灵敏度及特异性。本产品中含有通用 ROX, 适用于所有 qPCR 仪器, 无需在不同的仪器上调整 ROX 的浓度, 只需在配制反应体系时加入引物和模板即可进行扩增。具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点, 可最大限度地减少人为误差、节约 PCR 实验操作时间、降低污染机率。

产品组分

组分名称	NG042S	NG042M
2 X Realtime SYBR qPCR Mixture (Universal)	1mlx5	1mlx50

注意事项:

- 使用前请上下颠倒轻轻混匀, 尽量避免起泡, 并经短暂离心后使用。
- 尽可能减少 2 X Realtime SYBR qPCR Mixture (Universal) 在光下的曝露时间, 长时间曝光可导致荧光信号减弱。
- 反应液的配制、分装请一定使用无污染枪头、Microtube 等, 尽量避免交叉污染。
- 本品不能用于杂交探针法。

使用方法:

用户需自备的试剂: cDNA 或 DNA 模板、引物。

请按照不同品牌荧光定量 PCR 仪的使用说明书要求进行实验操作。

操作示例: 分别以 20 μl 和 50 μl PCR 反应体系为例:

1. PCR 反应体系的配制:

组分	20ul 体系	50ul 体系
DNA 模板	1 μl	1 μl
上游引物(10 μM)	0.5 ul	1 ul
下游引物(10 μM)	0.5 μl	1 μl
2 X Realtime SYBR qPCR Mixture (Universal)	10 μl	25 μl
Sterile Water	补至 20 μl	补至 50 μl

注: 模板量: 10-100 ng 基因组 DNA 或 1-10 ng cDNA 为参照, 因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同, 可对模板进行梯度稀释, 以确定最佳的模板使用量。另外, Two Step RT-PCR 反应的 cDNA (RT 反应液) 作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

引物: 通常引物浓度以 0.2 μM 可以得到较好结果, 可以终浓度 0.1-1.0 μM 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下, 可提高引物的浓度; 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度, 由此优化反应体系。为了获得理想的 qPCR 的效果, 扩增片段的长度建议为 80-200 bp。

2. PCR 反应条件的设置:

两步法 PCR 扩增标准程序:

两步法流程	温度	时间
预变性	95°C	2 min
变性	95°C	10 sec
退火-延伸	60°C	15-30 sec
融解曲线		机器默认设置



预变性时间：标准程序选择 2 min，适合大多数模板；快速程序最短可选择 30 s；复杂或高 GC 模板，可适当延长预变性时间至 5 min。

变性时间：标准程序 10 s；快速程序最短可选择 3 s。

退火/延伸温度：对于复杂模板、高 GC 含量的扩增子，建议增加退火和延伸温度至 68°C。

退火/延伸时间：标准程序 30 s，可以满足绝大多数的 qPCR 实验；对 200 bp 以内的扩增子，延伸时间最短可设置为 10 s；对于超过 350 bp 或者高 GC 含量的扩增子，建议增加延伸时间至 40 s 或者采用三步法以提高扩增效率。

当两步法扩增效率不好的时候建议选择三步法进行 qPCR 反应。

三步法流程	温度	时间
预变性	95°C	2 min
变性	95°C	15 sec
退火	60°C	15-30 sec 40 个循环
延伸	72°C	30 sec
融解曲线		机器默认设置

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。

3. 在相应的 real time PCR 仪器上完成实验，并分析结果。

