

2 X Realtime SYBR qPCR Mixture (High-ROX)

货号: NG032S 5x1ml
NG032M 50x1ml

储存条件: -20°C 可存放 12 个月, 4°C 可存放一月。避免反复冻融

产品简介:

本产品是采用 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。本产品含有优化浓度的抗体修饰热启动 Taq DNA Polymerase、SYBR Green I、dNTPs、Mg²⁺ 反应缓冲液和稳定剂等成分。主要用于基因组 DNA 靶序列和 RNA 反转录后 cDNA 靶序列的检测,

本产品为 2×浓度预混实时荧光定量快速 PCR 反应体系 (High ROX 使用时请选择对印机型)

使用时只需加入模板、引物和水, 使其工作浓度为 1×, 即可进行反应。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、降低污染几率

产品组分

组分名称	NG032S	NG032M
2×Realtime SYBR qPCR Mix (High ROX)	5x1ml	50x1ml

参照事项:

参照染料 ROX: 对于某些固定型号的仪器, 必须添加 ROX 才能精确测定 Ct 值。ROX 的使用浓度可以参照以下。

无需加 ROX Reference Dye 的机型: (NG012)

Thermal Cycler Dice Real Time System, LightCycler, Smart Cycler System, Corbett Rotor-gene 6000, Agilent Technologies Mx3000P 等荧光定量 PCR 仪

需加 Low ROX Reference Dye (50×)的机型: (NG022)

ABI Prism7500 /7500 Fast, MJ Research Chromo4, Opticon (II), Corbett Rotor Gene 3000。

需加 High ROX Reference Dye (50×)的机型: (NG032)

ABI Prism7000/7300/7700/7900HT 和 ABI Step One /ABI Step One Plus。

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×Realtime SYBR qPCR Mix 在光下的曝露时间, 长时间的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的枪头、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×Realtime SYBR qPCR Mix (Low ROX)	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:

本制品中使用的 Taq DNA Polymerase 是利用抗 Taq 抗体封闭的 HotStart DNA 聚合酶，如果在 PCR 反应前进行模板的预变性，通常设定为 95°C、2 min，复杂或高 GC 模板适当延长至 5 min。该 DNA 聚合酶在 15 s 内可完成至少 300 bp 的扩增，可以满足绝大多数的 qPCR 实验；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 60 s 或者采用三步法以提高扩增效率。

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	15 sec	40 个循环
退火-延伸	60°C	15-30 sec	
融解曲线			机器默认设置

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	40 个循环
退火	60°C	15-30 sec	
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. 分析实验数据。