

快速荧光定量PCR预混试剂 (SYBR Green)

使用说明书 (Ver.0.0.1)

产品特点

- ✧ 快速的染料法荧光定量试剂。

产品货号：

JSR-E-605-125 (125 次反应) JSR-E-605-500 (500 次反应)



扫描二维码了解更多产品信息

目录 Contents

产品组份	1
储存条件	1
产品简介	1
产品特性	1
适用范围	2
操作步骤	3
注意事项	3

产品组份

试剂盒组成	125 次	500 次
2×Fast qPCR PreMix (SYBR Green)	1.25 ml	4×1.25 ml
50×ROX Reference Dye	250 μl	1 ml
RNase-Free ddH2O	1 ml	5×1 ml

*本试剂盒中不提供 50×ROX Reference Dye，如有需要请单独购买

储存条件

本产品于 -30~-15℃可保存 12 个月。收到本产品后，请立即置于-30~-15℃下避光保存。从-30~-15℃取出使用时，将冻存的 2×Fast qPCR PreMix (SYBR Green) 和 50×ROX Reference Dye 融解，然后轻轻颠倒混匀，待溶液完全均一后再行使用。如解冻后没有使用，须彻底混匀后重新冷冻。（在解冻过程中盐会出现分层现象，未混匀进行冷冻，盐晶体的析出将会对酶造成伤害）。如需一段时间内经常取用，可在 2-8℃下保存，保质期 3 个月，避免反复多次冻融。

产品简介

本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real-Time PCR 的专用试剂，可对目标 DNA 进行快速、特异性的定量检测。优化的预混液可缩短 Real-Time PCR 的反应时间,适用于标准或快速 PCR 仪。Fast qPCR PreMix 采用了抗体修饰的 Anti Taq DNA 聚合酶，配合独特的快速 PCR Buffer 体系可确保在所有的 Real-Time PCR 仪上进行灵敏的 qPCR 反应，具有反应快速、PCR 反应时间缩短 60%，同时具有高扩增效率，高扩增特异性和宽广的可信范围的特点，在不影响 PCR 效果的前提下更快获得高准确性结果，并节约科研时间和能源。

产品特性

- ✧ 反应速度快：Fast qPCR PreMix 采用了抗体修饰的 Anti Taq DNA 聚合酶，配合特制的快速 PCR Buffer 体系，可大大缩短变性、退火与延伸时间，可节省多达 60%的反应时间，快速获得实验结果；
- ✧ 扩增能力强：本产品特制的快速 PCR Buffer 体系含有独特的 PCR 稳定因子，在不损失 PCR 灵敏度和特异性的基础上进行快速反应，保证了 FastFire qPCR PreMix 高扩增效率，高扩增特异性和宽广的可信范围的特点；
- ✧ Fast qPCR PreMix 中预混有 SYBR Green I，PCR 反应液配制时，只需加入模板、引物、灭菌蒸馏水便可进行快速 Real-Time PCR 反应，操作简单方便。
- ✧ 本产品附带 ROX Reference Dye，用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差,方便客户针对不同型号的荧光定量 PCR 仪,选择对应浓度的 ROX Reference Dye 使用。

适用范围

染料法荧光定量 PCR 实验。

操作步骤

(一) 建立 Real-Time PCR 反应体系：

请注意将 Fast qPCR PreMix 和 50×ROX Reference Dye 避光保存。

- 1. 融解 2×Fast qPCR PreMix (SYBR Green) ， 50×ROX Reference Dye， 模板， 引物和 RNase-Free ddH2O， 彻底混匀， 短暂离心后置于冰浴上。
- 2. 建议置于冰上进行 Real-Time PCR 反应液的配制。

反应体系：

试剂盒组成	体积/反应
2×Fast qPCR PreMix (SYBR Green)	10 μl
正向引物 (10μM)	0.6 μl
反向引物 (10μM)	0.6 μl
cDNA 模板	10pg-1μg
50×ROX Reference Dye	根据不同仪器添加
RNase-Free ddH2O	补水至 20 μl
总体系	20 μl

*引物终浓度为 300nM 可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效果不高时，可增加 PCR 反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少 PCR 反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的，可以在 200-500nM 范围内调整。

*几种常见仪器的匹配 ROX Reference Dye 浓度见下表：

仪器	终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/StepOne 等	5× (例如： 5 μl ROX / 50 μl 体系)
ABI 7500/7500 Fast; Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000	1× (例如： 1 μl ROX / 50 μl 体系)
Roche 仪器， Bio-Rad 仪器， Eppendorf 仪器等	不用添加

(二) 进行 Real Time PCR 反应

建议采用两步法 PCR 反应程序进行反应；若模板量较低等因素导致扩增效果不佳，可使用三步法程序进行 PCR 反应。

两步法反应程序：

反应温度	反应时间	反应循环数	说明
95℃	1 min	1	预变性
95℃	5 sec	40	PCR 循环步骤，
60℃	15 sec		请在该步骤收集荧光

熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)

三步法反应程序：

反应温度	反应时间	反应循环数	说明
95℃	1 min	1	预变性
95℃	5 sec	40	PCR 循环步骤
50-60℃	10 sec		
72℃	15 sec		请在该步骤收集荧光

熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)

*请先使用 60℃15s 进行扩增。如果需要进一步优化，可以尝试在 56-66℃范围内进行。

*使用不同型号仪器进行时间设定时，请按照仪器使用说明书要求进行实验操作，几种常见仪器的时间设定见下表：

仪器	时间
ABI 7700/7900HT/7500Fast, Roche, Bio-Rad 和 Agilent 等公司荧光定量 PCR 仪	15 sec
ABI 7000/7300	31 sec
ABI 7500	32 sec

通常引物退火温度比引物的解链温度 (Tm) 低 5℃，如果引物碱基数较少，可以适当提高退火温度，可以增加 PCR 的特异性；如果碱基数较多，可以适当降低退火温度。

3. 盖上反应管，轻柔混匀。可短暂离心，确保所有组分均在管底。
4. 将反应体系置于荧光定量 PCR 仪中，开始反应。

注意事项

1. 本产品中含有荧光染料 SYBR Green I，保存本产品或配制 PCR 反应液时应避免强光照射。
2. 如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。使用时请上下颠倒轻轻混匀，请不要使用振荡器进行混匀，尽量避免出现泡沫，并经瞬时离心后使用。
3. 引物纯度对反应特异性影响很大，建议使用 PAGE 级别以上纯化的引物。
4. 引物终浓度为 0.3μM 可以在绝大多数体系中获得良好的扩增结果。如果需要进一步优化，可以在 0.2-0.5μM 范围内调整引物浓度。
5. 20μl 反应体系中，cDNA 模板的使用量一般小于 100ng，基因组 DNA 模板量一般小于 50ng，逆转录产物作为模板时，逆转录体系的使用量应不超过 PCR 体系终体积的 20%。