

2× qPCR Green Fast Mixture

2× 预混实时荧光定量快速 PCR 反应体系

【产品简介】

本产品采用Sybrgreen 嵌合荧光法进行荧光定量的专用试剂。制品中含有荧光定量反应的最适浓度 Sybrgreen，是一种2×浓度的预混试剂，进行实验时，PCR 反应液的配制十分方便简单。制品中使用了 antiTaq 抗体的Hot Start 法用DNA 聚合酶，与荧光定量反应适合Buffer 组合，可以有效抑制非特异性的 PCR 扩增，大大提高PCR 的扩增效率，可以进行高灵敏度的荧光定量扩增反应。另外，本产品中添加了 Tli RNaseH (耐热性RNaseH)，以cDNA 作为模板进行PCR 反应时，可以很好地抑制由于cDNA 中残存 mRNA对PCR 反应造成的阻害作用。适合于快速荧光定量扩增反应，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量、检测，重复性好，可信度高。

【产品编号】

产品编号	产品名称
C06-01007	2× qPCR Green Fast Mixture
C06-01008	2× qPCR Green Fast Mixture (with ROX)
C06-01009	2× qPCR Green Fast Mixture (with ROX II)

注：不同仪器所需 ROX Reference Dye 不同，请根据实际需求选择适合的试剂，各试剂适用机型请参考：

C06-01007: Thermal Cycler Dice Real Time System , LightCycler , Smart Cycler System , Corbett Rotor-gene6000,Mastercycler@eprealplex,LightCycler480,CFX96TM,CFX384TM 荧光定量 PCR 仪等。

C06-01008: ABI Prism7000/7300/7700/7900HT 和 ABI Step One /ABI Step One Plus 荧光定量 PCR 仪。

C06-01009: ABI Prism7500/7500 Fast 荧光定量 PCR 仪 , MJ Research Chromo4,Opticon (II) , Corbett Rotor Gene 3000 , Agilent Technologies Mx3000P 荧光定量 PCR 仪。

【规格和组分】

	1ml	1ml×5	1ml×10
2× qPCR Green Fast Mixture	1ml×1	1ml×5	1ml×10
ROX Reference Dye (50X)	40ul	200ul	200ul×2

【保存】 -20℃恒温避光保存两年，避免反复冻融。如经常使用，可置于 4℃保存至少六个月。

【注意事项】

- 使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免气泡，并经短暂离心后使用。
- 尽可能减少 qPCR Green Fast Mixture 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头、Microtube 等，尽量避免交叉污染。

【使用方法】

用户需自备的试剂：cDNA 模板或 DNA 模板、引物、ddH₂O 等。

请按照不同品牌荧光定量 PCR 仪的使用说明书要求进行试验操作。

操作示例：分别以 20ul 和 50ul PCR 反应体系为例

1. PCR 反应体系的建立：

试剂	使用量	使用量	终浓度
DNA 模板	2ul	4ul	【1】
正向引物 (10uM)	0.4ul	1ul	0.2uM 【2】
反向引物 (10uM)	0.4ul	1ul	0.2uM 【2】
2X qPCR Green Fast Mixture	10ul	25ul	1×
ROX Reference Dye	0.4ul	1ul	1× 【3】
RNase-free ddH ₂ O	补足至 20ul	补足至 50ul	【4】

1. 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%。
2. 引物: 通常引物浓度以 0.2uM 可以得到较好结果, 可以终浓度 0.1~1.0uM 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,
3. 不同仪器所需 ROX Reference Dye 不同, 或需要添加或不需要添加, 请根据仪器说明进行操作。
4. 按照各仪器推荐体系进行反应液配制。

2. PCR 反应条件的设置

本产品是利用 anti-Taq 抗体的 Hot Start 用 DNA 聚合酶, 与其他公司的化学修饰型 Hot Start 用 DNA 聚合酶相比, 不需要 PCR 反应前的 95°C、5~15 分钟的酶的活性化反应。如果高温处理时间过长, 会使酶的活性下降, 其 PCR 的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。如果在 PCR 反应前进行模板的预变性, 通常设定为 95°C、30 秒。

两步法 PCR 扩增标准程序

95°C	30sec	} 40Cycles
95°C	5sec	
60°C	30~31sec*	

溶解曲线 (仪器自动设置)

注: *: 使用 StepOnePlus 时请设定在 30 秒, 使用 7300 时请设定在 31 秒。

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, 并根据此比例放大或缩小反应体系。如果以上两步法程序得不到良好的实验结果时, 请再进行 PCR 条件的优化。由于使用 T_m 值较低的引物等原因, 两步法 PCR 反应扩增性能较差时, 可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

3. 标准曲线制作和结果分析

反应结束后确认荧光定量 PCR 的扩增曲线和融解曲线, 进行 PCR 定量时制作标准曲线等。

分析方法参见仪器的操作手册。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下, 本公司对此产品所承担的责任, 仅限于此产品的价值本身。