

2x Fast qPCR Master Mixture (Green) 体系使用说明—染料法

货号：DN2055-05

保存：-20°C

【试剂概述】

本体系是用于染料法（SYBR Green I）实时荧光定量的预混体系。产品含有优化浓度的 Hot Di Taq DNA Polymerase、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。优化浓度的 SYBR Green I 荧光染料，特异性地掺入 DNA 双链后，荧光信号增强，而不掺入链中 SYBR Green I 染料分子荧光信号不变，从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步，荧光可以在退火或延伸阶段测定。

本体系为 2×预混实时荧光定量 PCR 反应体系，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。

【试剂组分】

组分名称	DN2055-01	DN2055-05	DN2055-10	DN2055-100
2XFast qPCR Master Mixture (Green) *	1.1ml	1.1ml*5	1.1ml*10	1.1ml*100

* 本试剂中不含 ROX Dye 如需要请根据机型要求添加

【注意事项】

- 使用前请上下轻轻颠倒混匀，尽量避免气泡，并经短暂离心后使用。
- 尽量减少产品在光下暴露的时间，避免荧光信号减弱。
- 本品不能用于杂交探针法。

【保存条件】 -20°C恒温避光保存两年，4°C保存三个月。

【使用方法】

标准操作流程：

以 20μlPCR 反应体系为例

- PCR 反应体系建立：

组分	体积
DNA 模板	1 μl
上游引物(10 μM)	0.5 μl
下游引物(10 μM)	0.5 μl
2XFast qPCR Master Mixture (Green)	10 μl
DEPC-ddH ₂ O	补至 20 μl

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。

不同仪器所需 ROX Reference Dye 不同，或需要添加或不需添加，请根据仪器说明进行操作。

按照各仪器推荐体系进行反应液配制。

2. PCR 反应条件设置:

本产品中使用的 Hot Di Taq DNA Polymerase 是利用抗 Taq 抗体封闭的 Hot Di DNA 聚合酶, 如果在 PCR 反应前进行模板的预变性, 通常设定为 94°C、2 min, 复杂或高 GC 模板适当延长至 5 min。该 DNA 聚合酶在 15 sec 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 sec 或者采用三步法以提高扩增效率。

两步法流程	温度	时间
预变性	94°C	2 min
变性	94°C	15 sec
退火/延伸	60°C	30 sec
融解曲线		机器默认设置
三步法流程	温度	时间
预变性	94°C	2 min
变性	94°C	15 sec
退火	60°C	15 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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 承诺为您更换等量合格产品, 本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。