

版本号: FP220927

FastReal qPCR PreMix (SYBR Green)

FastReal快速荧光定量PCR

预混试剂 (SYBR Green)

目录号: FP217

产品内容

产品组成	FP217-01 20 μ l \times 125 rxn	FP217-02 20 μ l \times 500 rxn	FP217-03 20 μ l \times 5000 rxn
2 \times FastReal qPCR PreMix (SYBR Green)	1.25 ml	4 \times 1.25 ml	10 \times 4 \times 1.25 ml
50 \times ROX Reference Dye	250 μ l	1 ml	10 \times 1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	5 \times 1 ml	10 \times 5 \times 1 ml

储存条件

收到本产品后, 请立即置于-30~-15 $^{\circ}$ C下避光保存。保质期12个月。

从-30~-15 $^{\circ}$ C取出使用时, 将冻存的2 \times FastReal qPCR PreMix (SYBR Green)和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损害)。如需一段时间内经常取用, 可在2-8 $^{\circ}$ C下保存, 保质期3个月。避免反复多次冻融。

试剂盒简介

本产品是采用SYBR Green嵌合荧光法进行Real-Time PCR的专用试剂，可对目标DNA进行高灵敏度、快速、高特异的定量检测。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qPCR仪。

FastReal qPCR PreMix中用到的热启动Taq DNA聚合酶经过新型抗体修饰，配合优化的快速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，高扩增效率，高扩增特异性，高灵敏度，扩增曲线起峰早，荧光值高等特点，使你在不影响PCR效果的前提下更快获得结果，节约科研时间和能源。

试剂盒特点

- 1. 反应快速。**预混Mix中的热启动型Taq DNA聚合酶，热启动时间短，酶活性高，反应快速；反应Buffer中的组分，经过针对性改造，可大大缩短变性、退火与延伸时间，可节省多达50%的反应时间，快速获得实验结果。
- 2. 扩增能力强。**新的热启动Taq DNA聚合酶，配合优化的PCR Buffer体系，保证了试剂的高扩增效率和产物的特异性，并且具有扩增曲线起峰早，荧光值高的特点。
- 3. 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荧光定量PCR仪时选择对应浓度使用。
- 4. 仪器广泛适用。**不仅适用于快速定量仪器，同样适用于普通定量仪器。

注意事项

- 1. 配制PCR预混液时要注意混匀充分，**如果试剂没有混匀，会导致PCR组分局部浓度过高，使得反应性能下降。
 - 2. 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。
 - 3. 引物终浓度为0.3 μM 可以在大多数体系中**获得良好的扩增结果。如果需要进一步优化，可以在 0.2-0.5 μM 范围内调整引物浓度。
 - 4. 20 μl 反应体系中，cDNA模板的使用量**一般小于100 ng，基因组DNA模板量一般小于50 ng，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%。
-

操作方法

<1> 建立Real-Time PCR反应体系:

请注意将50 × ROX Reference Dye避光保存。

1. 融解2×FastReal qPCR PreMix (如果保存在-30~-15°C), ROX Reference Dye, 模板, 引物和RNase-Free ddH₂O, 并将所有试剂在室温下溶解并彻底混匀。
2. 建议置于冰上进行Real-Time PCR反应液的配制。

反应体系:

组成成分	50 μl 体系	25 μl 体系	20 μl 体系	终浓度
2×FastReal qPCR PreMix (SYBR Green)	25 μl	12.5 μl	10 μl	1×
正向引物 (10 μM)	1.5 μl	0.75 μl	0.6 μl	300 nM*
反向引物 (10 μM)	1.5 μl	0.75 μl	0.6 μl	300 nM*
cDNA模板	—	—	—	-ng-pg
50×ROX Reference Dye [△]	—	—	—	—
RNase-Free ddH ₂ O	至50 μl	至25 μl	至20 μl	—

* 引物终浓度为300 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时, 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200-500 nM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 7000/7300/7700/7900/7900HT/7900HT Fast、StepOne™/ StepOne Plus™	5×(例如: 5 μl ROX/50 μl 体系)
ABI 7500/7500 Fast、ViiA 7、QuantStudio™ 3/5/6 Flex/7 Flex/12K Flex; Agilent 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

<2>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。



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

两步法反应程序：

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C	2 min	预变性	否
PCR 反应	40×	95°C	5 sec	变性	否
		60°C ^{△1}	15 sec ^{△2}	退火/延伸	是
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)					

三步法反应程序：

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C	2 min	预变性	否
PCR 反应	40×	95°C	5 sec	变性	否
		50-60°C ^{△3}	10 sec ^③	退火	否
		72°C	15 sec ^{△2}	延伸	是
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)					

△1 请先使用60°C 15 sec进行扩增。如果需要进一步优化，可以尝试在56-66°C 范围内进行。

△2 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：

使用ABI 7700/7900HT/7500 Fast, Roche, BioRad和Agilent等公司荧光定量PCR仪时请设定在15 sec。
使用ABI 7000和7300时请设定在31 sec。
使用ABI7500时请设定在32 sec。

△3 通常引物退火温度比引物的解链温度(Tm)低5°C，如果引物碱基数较少，可以适当提高退火温度，这样可以使PCR的特异性增加；如果碱基数较多，那么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。