



2× Robust SYBR Green qPCR ProMix with High ROX

货号: S015A/B

- 产品内容

组分	S015A	S015B
2× SYBR Green qPCR ProMix with High ROX	1mL	1mL× 5

- 储存条件

收到本产品后, 请立即置于-20℃保存。从-20℃取出使用时, 将冻存的 2× SYBR Green qPCR ProMix with High ROX 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。

● 产品简介

本品是应用嵌合荧光法进行实时荧光定量 PCR (qPCR) 和两步法反转录 qPCR (RT-qPCR) 的专用 2× 即用型优化预混液, 内含热启动 Taq DNA 聚合酶、SYBR Green I 荧光染料、Mg²⁺、dNTPs、优化缓冲液和稳定剂等。使用本产品进行 qPCR 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。

本品所用 Hotstart Taq DNA 聚合酶是一种基于化学修饰技术改良的重组 Taq DNA 聚合酶。室温下该酶的活性位点被完全封闭, 不具有聚合酶活性, 必须在 95°C 加热 10min 才能被完全激活并发挥作用, 从而有效避免引物二聚体和非特异性扩增, 实现 PCR 扩增最大精准化, 该特性显著优于基于核酸适配体或抗体修饰技术的热启动酶。因此, 本品是分子诊断和其它 PCR 应用的理想选择。

● 适用机型

本品包含用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差的 ROX Reference Dye, 适用于以下荧光定量 PCR 仪:

Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne™, StepOnePlus™;
其他需要添加高浓度 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪。

● 实验时注意事项

- 1) 本品属于化学修饰的热启动酶, 95°C 预变性满 10min 方能充分释放 DNA 聚合酶活性。
- 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) 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, 使用量应不超过 PCR 体系终体积的 10%。

操作方法

1. 反应体系准备

- 1) 将 2× SYBR Green qPCR ProMix with High ROX, 模板, 引物和 Nuclease Free ddH₂O 等试剂在室温下溶解, 上下颠倒混匀后离心至管底。
- 2) 建议在冰上进行 Real-Time PCR 反应液的配制, 反应体系如下所示。

Add Nuclease-Free ddH ₂ O	To 20 μL
2× SYBR Green qPCR ProMix with High ROX	10 μL
Forward Primer (10μM) ☆	0.5 μL
Reverse Primer (10μM) ☆	0.5 μL
cDNA 模板 ☆☆	Optional

☆☆ 引物终浓度为 0.25 μM 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 0.2-0.5 μM 范围内调整。

☆☆ 如模板类型为未稀释 cDNA 原液, 使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。

- 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。

2. Real-Time PCR 反应程序设定

建议采用如下反应程序:

阶段	温度	时间	循环	荧光信号采集
预变性	95℃	10 min	1×	否
PCR 反应	95℃	10 Sec	40×	否
	60℃ ^Δ	30 Sec☆☆☆		是
熔解曲线分析				

☆☆☆ 部分 qPCR 仪器的退火及延伸时间必须设定在 30 Sec 以上时, 请以最小值设定即可。

3. 设置好反应程序后, 将反应体系置于荧光定量 PCR 仪中, 并立即运行反应程序。