

SYBR Green *Pro Taq* HS预混型 qPCR 试剂盒 (含示踪染料)

 SYBR Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Tracking Kit

Code No. AG11733

包装量:	500 rxns / 20 μ l
保存温度:	-20 $^{\circ}$ C

产品概述

本产品是采用 SYBR Green 嵌合荧光法进行 qPCR 的专用试剂, 2X Premix 中添加了蓝色染料, 搭配黄色模板稀释液, 实现移液过程可视化: 将黄色稀释液与模板混匀后, 加入到蓝色的反应液中, 溶液会从蓝色变成绿色, 可根据颜色变化确认是否添加模板, 有利于大量样品的加样, 减少了误操作概率。

本产品中 SYBR Green 浓度、PCR 反应体系都进行了优化, 采用了反应性能优越的 *Pro Taq* HS 体系 (混合了 Taq 抗体), 能够有效抑制非特异性扩增, 提高 PCR 扩增效率, 可以进行高灵敏度的 Real Time PCR 反应, 可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线, 从而对靶基因进行准确定量、检测。

保存及运输

保存温度: -20 $^{\circ}$ C (避光保存)

运输温度: 干冰运输或-20 $^{\circ}$ C冰袋运输。

产品组成

2X SYBR Green <i>Pro Taq</i> HS Premix (Blue) *	1 ml x 5 pcs
40X Dilution Buffer (Yellow)	500 μ l

*: 溶液在 -20 $^{\circ}$ C 存放时可能会产生沉淀, 使用前可于冰上溶解或手握溶解, 颠倒混匀至沉淀全部消失; 请勿涡旋振荡。

实验操作

(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems 为例)
反应体系 (20 μ l)

组分名称	反应终浓度	加入量
2X SYBR Green <i>Pro Taq</i> HS Premix (Blue) ^{*1}	1X	10 μ l
Template ^{*2}	\leq 100 ng	-
40X Dilution Buffer (Yellow) ^{*4}	1X	0.5 μ l
Primer F(10 μ M)	0.2 μ M ⁵	0.4 μ l
Primer R(10 μ M)	0.2 μ M ⁵	0.4 μ l
ROX Reference Dye (4 μ M) ^{*6}	0.08 μ M	0.4 μ l
RNase free water	-	up to 20 μ l ⁷

*1: 该溶液避免反复冻融, 防止酶活降低; 使用前可上下颠倒混匀, 请勿 vortex 振荡混匀; 溶液中含有 SYBR Green I, 操作过程中注意避免强光照射。

*2: 在 20 μ l 体系里, DNA 模板添加量通常建议 \leq 100 ng; 如果使用本产品进行 cDNA 的定量 PCR 扩增, cDNA 原液使用体积不要超过定量 PCR 反应总体积的 10%。必要时可以将模板进行梯度稀释, 以确定合适的模板添加量。

*3: 如果不需要模板移液示踪, 可直接使用常规的 DNA 或 cDNA 模板, 用 RNase free water 代替 40X Dilution Buffer (Yellow); 如果需要模板移液示踪, 请先将模板与 40X Dilution Buffer (Yellow) 混匀, 再加入至反应预混液中。

例如，定量体系为 20 μ l，加入 2 μ l 的 cDNA 模板，具体操作如下：若模板不需要稀释，可在 10 μ l cDNA 模板中加入 2.5 μ l 40X Dilution Buffer，然后加 2.5 μ l 的混有 Dilution Buffer 的模板至蓝色的预混液中；若模板需要稀释，应先用 RNase free water 正常稀释，再按比例添加 40X Dilution Buffer（不能使用 Dilution Buffer 替代 RNase free water 稀释模板）。

- *4: 40X Dilution Buffer (Yellow) 请严格按照表格中推荐量加入，用量过多可能会影响扩增性能，用量过少可能颜色变化不明显。
- *5: 引物通常使用终浓度为 0.2 μ M，也可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整。
- *6: 请按照不同仪器推荐的反应体系配制反应液。如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准，请按照仪器推荐量添加。若不需要使用 ROX 的 PCR 仪，ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。
- *7: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。

qPCR 反应条件

（两步法 PCR 反应程序）*1

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	5 sec	} 40
退火和延伸	60°C	30 sec	
熔解曲线采集 ^{*2}	95°C	15 sec	} 1
	60°C	1 min	
	95°C	1 sec	

*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序，如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件；如果引物 Tm 值较低，导致两步法扩增效率较差，可采用三步法进行 PCR 扩增（三步法 PCR 反应程序可参考附录1）。

*2: 此步为必须步骤，此熔解曲线为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems Standard 模式下默认程序。不同仪器的熔解曲线采集程序不同，选用仪器对应的默认程序即可。

详细信息请查阅 www.agbio.com.cn

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

➤ 结果检测

反应结束后，确认扩增曲线和熔解曲线，并进行标准曲线分析。
（分析方法请参照仪器操作手册）

➤ 附录 1: 三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	5 sec	} 40
退火	55°C	30 sec	
延伸	72°C	30 sec	
熔解曲线采集	见两步法 PCR 熔解曲线采集程序		1

➤ 附录 2: 适用的部分定量 PCR 仪

- 无需添加 ROX Reference Dye 的定量 PCR 仪：
（Bio-Rad）IQ5, CFX96™, CFX384™, CFX Connect™, MJOpticon, Opticon 2;
（Roche）LightCycler®2.0, 480, 96;
（Analytik Jena）qTOWER3.
- 需要添加 ROX Reference Dye (20 μ M) 的定量 PCR 仪：
（ROX Reference Dye 终浓度为 0.4 μ M）
（Thermo）ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus.
- 需要添加 ROX Reference Dye (4 μ M) 的定量 PCR 仪：
（ROX Reference Dye 终浓度为 0.08 μ M）
（Thermo）ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio™ 3 / 5, QuantStudio™ 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™ Dx;
（Agilent）Mx3000P™, Mx3005P™, MX4000™.