

版本号: FP230630

Talent qPCR PreMix (SYBR Green)

Talent荧光定量检测试剂盒(SYBR Green)

目录号: FP209

产品内容

| 产品组成 | FP209-01 20 μ l \times 125 rxn | FP209-02 20 μ l \times 500 rxn | FP209-03 20 μ l \times 5000 rxn |
|--|---|---|--|
| 2 \times Talent 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

本产品于 -30~-15 $^{\circ}$ C可保存12个月。收到本产品后, 请立即置于-30~-15 $^{\circ}$ C避光保存。从-30~-15 $^{\circ}$ C取出使用时, 将冻存的2 \times Talent qPCR PreMix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条件下储存3个月。避免反复多次冻融。

产品简介

本产品是采用SYBR Green I嵌合荧光法进行Real-Time PCR的专用试剂, 可对目标DNA进行快速、特异性的定量检测。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PCR仪。

2 \times Talent qPCR PreMix采用了抗体修饰的Anti Taq DNA聚合酶, 配合独特的qPCR Buffer体系可确保本产品在所有的Real-Time PCR仪上进行高灵敏的快速qPCR反应, qPCR反应时间可缩短50%。此外, Buffer中添加了H-Competitor因子和EP组分, 还使得本产品具有广泛的样本普适性, 对具有复杂高级结构的模板、PCR抑制剂残留较多的模板以及长片段扩增等具有非常好的适用性。同时本产品还具有高扩增效率, 高扩增特异性和宽广的可信范围等特点, 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. 2 × Talent qPCR PreMix采用了抗体修饰的Anti Taq DNA聚合酶，配合特制的快速qPCR Buffer体系，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. 本产品中特别添加了H-Competitor因子，能够竞争氢键、增强双链的打开强度，使本产品具有广泛的样本普适性，对具有复杂高级结构的模板和长片段扩增等具有非常好的适用性。
3. 本产品特制的快速PCR Buffer体系含有独特的PCR稳定因子——EP，能够有效的保护酶活，抵御各种PCR抑制剂的干扰，保证了2 × Talent qPCR PreMix高扩增效率，高扩增特异性、高扩增灵敏度和宽广的可信范围的特点。
4. 2 × Talent qPCR PreMix中预混有SYBR Green I，PCR反应液配制时，只需加入模板、引物、灭菌蒸馏水便可进行快速Real-Time PCR反应，操作简单方便。
5. 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。
6. 2 × Talent qPCR PreMix采用无色透明管包装，经检测，光照不会影响体系的定量的结果。

试剂盒原理

本产品采用了特异的抗体修饰热启动DNA聚合酶进行快速PCR扩增，通过检测反应进程中SYBR Green I的荧光强度，达到检测PCR产物扩增量的目的，适用于标准和快速PCR仪。

1. 本产品中特异的抗体修饰热启动DNA聚合酶，95°C条件下孵育3 min即可激活全部酶活，在缩短变性时间的同时避免了非特异性产物的扩增，可大大缩短变性、退火和延伸时间，使PCR总运行时间缩短50%，更快获得实验结果，而不影响PCR反应效果。
2. 本产品的快速PCR Buffer体系添加了独特的H-Competitor因子和EP组分，配合精心优化的快速PCR Buffer体系，对具有复杂高级结构的模板、PCR抑制剂残留较多的模板以及长片段扩增等具有非常好的适用性。
3. 本产品针对cDNA模板和gDNA模板结构组成的差异，对PCR的体系反应步骤进行了特别的优化，使较难扩增的gDNA模板也能获得良好的PCR结果。

注意事项

1. 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。
 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，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 × Talent 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 × Talent qPCR PreMix | 25 μl | 12.5 μl | 10 μl | 1 × |
| 正向引物 (10 μM) | 1.5 μl | 0.75 μl | 0.6 μl | 0.3 μM* |
| 反向引物 (10 μM) | 1.5 μl | 0.75 μl | 0.6 μl | 0.3 μM* |
| 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0.3 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。

[△]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 | 3 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 | 3 min | 预变性 | 否 |
| PCR 反应 | 40× | 95°C | 5 sec | 变性 | 否 |
| | | 50-60°C ^{△3} | 10 sec | 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。

^{△3} 通常引物退火温度比引物的解链温度(T_m)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，那么可以适当减低退火温度。

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。