



2x Realab Green PCR Fast mixture 通用型

货号: R0202

储存条件: 长期保存请于 -20°C 避光保存, Mix 融解后可在 4°C 避光条件下稳定存放一个月, 尽量避免反复冻融。

产品简介

Taq SYBR® Green qPCR Premix 是 SYBR® Green I 嵌合染料法专用 qPCR 试剂, 为 2× 预混液, 包含除引物和 DNA 样品以外的所有 qPCR 组分, 可减少操作步骤, 缩短加样时间, 降低污染几率。其核心组分是经抗体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶, 配合精心优化的 Buffer 体系以及 PCR 反应促进因子, 使产品具有特异性强、扩增效率高等特点, 有效抑制非特异性扩增, 可对宽广浓度范围的模板进行准确定量, 获得稳定可靠的 qPCR 结果。

使用方法

1. 适配机型: 全机型通用

2. 使用注意

- ① 因 Mix 中预混有染料, 其保存或反应体系配制过程应避免强光照射;
- ② 使用前上下颠倒轻轻混匀 Mix, 请勿涡旋振荡混匀, 避免产生过多气泡。

3. 建议的 qPCR 反应体系

试剂	使用量	终浓度
Taq SYBR® Green qPCR Premix	10ul	1×
正向引物 (10uM)a	0.4ul	0.2uM
反向引物(10uM)a	0.4ul	0.2uM
DNA 模板 b	X ul	10~200 ng/20ul
Nuclease-Free Water	To 20ul	

a. 通常推荐的引物终浓度为 0.2uM, 反应效果不佳时可在 0.1~1uM 范围内进行调整;

b. 推荐的模板加样量为 1~2ul, 如模板类型为未稀释 cDNA 原液, 模板添加量不应超过总反应体系的 10%, 不同种类 DNA 模板中含有的靶基因拷贝数目不同, 必要时可进行梯度稀释, 以确定必要的 DNA 模板添加量。

4. qPCR 反应程序 (可根据机型适当调整)

两步法:

步骤	温度	时间	
预变性	95°C	30 sec	
变性	95°C	10 sec	40 个循环
退火&延伸 a	60°C	30 sec	
熔解曲线 b	使用仪器默认采集程序		

三步法:

步骤	温度	时间	
预变性	95°C	30 sec	
变性	95°C	10 sec	40 个循环
退火 a	55~65°C	10 sec	
延伸 a	72°C	30 sec	
熔解曲线 b	使用仪器默认采集程序		

a. 根据引物的 Tm 值进行退火&延伸 (退火) 温度的设定; 若扩增片段在 200bp 以内, 退火&延伸 (延伸) 时间可以设置为 15sec; 此外, 退火&延伸 (延伸) 时间的设置还需根据您使用的 qPCR 仪所需的最短数据采集时间自行调整;

b. 不同 qPCR 仪的熔解曲线采集程序有差别, 一般可使用仪器默认的熔解曲线采集程序。

5. 实验优化

若使用默认反应条件反应性能不佳时, 则需要对反应条件的优化, 可以从引物浓度以及扩增程序两个方面进行:

- ① 引物浓度调整: 当引物终浓度在 0.1~1.0uM 范围之间变化时, 引物浓度越低, 扩增特异性越高, 但扩增效率会有所下降。
- ② 扩增程序优化: 需提高扩增特异性, 可使用两步法程序或提高退火温度; 需提高扩增效率, 可使用三步法程序或延长延伸时间。





6. 引物设计原则

- (1) 扩增产物长度建议控制在 80~200bp; 引物长度为 18~25bp;
- (2) 正向引物和反向引物的 T_m 值相差不超过 1°C 为佳, T_m 值控制在 $58\sim 62^{\circ}\text{C}$ 为佳;
- (3) 引物的 GC 含量控制在 40%~60% 之间;
- (4) 引物 A、G、C、T 整体分布尽量要均匀, 避开 T/C 或者 A/G 的连续结构 (特别是 3'端);
- (5) 引物 3'端最后一个碱基最好为 G 或者 C;
- (6) 避开引物内部或者两条引物之间的互补序列;
- (7) 使用 NCBI BLAST 功能检索确认引物的特异性。

