

SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 II

 SYBR Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit II

Code No. AG11702

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，是一种 2X Premix 试剂，反应液配制简便。本产品中 SYBR Green I 浓度、PCR 反应体系都进行了优化，使其特异性强、PCR 扩增效率高，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工作曲线，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 保存

(避光保存，长期保存放置在 -20 $^{\circ}$ C，产品融化后可于 4 $^{\circ}$ C 保存 1 个月。)

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 II	1 ml x 5 pcs
---	--------------

*: 溶液在 -20 $^{\circ}$ C 存放时可能会产生白色或淡黄色的沉淀，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 System 为例)^{*1}
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 II ^{*2}	1X	10 μ l
Template ^{*3}	\leq 100 ng	-
Primer F (10 μ M)	0.4 μ M ^{*4}	0.8 μ l
Primer R (10 μ M)	0.4 μ M ^{*4}	0.8 μ l
ROX Reference Dye (4 μ M) ^{*5, *6}	0.08 μ M	0.4 μ l
RNase free water	-	up to 20 μ l

*1: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。

*2: 产品避免反复冻融，防止酶活降低；使用前可上下颠倒混匀，请勿涡旋振荡混匀；产品中含有 SYBR Green，操作过程中注意避光。

*3: 在 20 μ l 体系里，DNA 模板添加量通常在 100 ng 以下，必要时可以进行梯度稀释，以确定合适的模板添加量；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%。

*4: 引物通常使用终浓度为 0.4 μ M，也可以在 0.1 ~ 1.0 μ M 范围内调整。

*5: 如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准，可选择如下产品配合使用：

ROX Reference Dye (20 μ M) (AG11703)

ROX Reference Dye (4 μ M) (AG11710)

注：上述 ROX Reference Dye 产品建议 50X 稀释使用，如果实验结果不理想，可调整 ROX Reference Dye 添加量。

*6: 若不需要使用 ROX 的 PCR 仪，ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。

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 ^{*2}	1
变性	95°C	5 sec	} 40
退火和延伸 ^{*4}	60°C ^{*3}	30 sec ^{*3}	
熔解曲线采集 ^{*5}	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: 预变性时间通常设定为 30 sec, 如果模板变性困难, 可以延长预变性时间至 1~2 min。
- *3: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增延伸反应条件设定为 60°C、30 sec 时可以满足要求; 如需提高反应特异性, 可适当提高退火温度; 如需提高扩增效率, 或者 PCR 扩增产物较长, 则可将反应延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。
- *4: 此步骤进行荧光信号值采集。
- *5: **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。**

➤ 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)

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.

➤ 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 ^{*1}	72°C	30 sec	} 1
熔解曲线采集	见两步法 PCR 熔解曲线采集程序		

*1: 此步骤进行荧光信号值采集。

➤ 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 μM) 的定量 PCR 仪:

(ROX Reference Dye 终浓度为 0.4 μM)

(Thermo) ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus.

● 需要添加 ROX Reference Dye (4 μM) 的定量 PCR 仪:

(ROX Reference Dye 终浓度为 0.08 μM)

(Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio™ 3 / 5, QuantStudio™ 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™ Dx.