



# SuperReal 彩色荧光定量预混 试剂(Probe) (FP216) 操作指南

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170424

[WWW.TIANGEN.COM](http://WWW.TIANGEN.COM)

# 实验准备

1. cDNA 样本
2. 移液器及配套枪头 (RNase-free)
3. 1.5 ml 离心管 (RNase-free) , 200  $\mu$ l PCR管 (RNase-free)
4. 涡旋振荡器, 台式离心机, 金属浴/ PCR仪



# Step 1



融解 $2\times$  SuperReal Color PreMix,  $40\times$  Dilution Buffer,  $50\times$  ROX Reference Dye, cDNA模板, 引物、探针和RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀, 之后置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀, 简短离心以收集残留在管壁的液体。

## Step 2

建议在冰上进行下表进行Real Time PCR反应液的配制

组成成分	50 $\mu$ l 体系	25 $\mu$ l 体系	20 $\mu$ l 体系	终浓度
2 $\times$ SuperReal Color PreMix	25 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	1 $\times$
正向引物(10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.75 $\mu$ l	0.6 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M
反向引物(10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.75 $\mu$ l	0.6 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M
荧光探针(10 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
cDNA模板(含 Dilution Buffer)	—	—	—	—
50 $\times$ ROX Reference Dye	—	—	—	—
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	至50 $\mu$ l	至25 $\mu$ l	至20 $\mu$ l	—



## Tips

1. 配制定量混合液时，应首先确定所需的反应数量，然后在反应数量的基础上增加10%-20%，计算体系配制数量。例如，一共需要做5个定量反应时，则体系配制数量至少为6；一共需要做10个定量反应时，则体系配制数量至少为11；一共需要做20个定量反应时，体系配制数量至少为22。以此类推。
2. 按配制数量，先计算除cDNA模板和水之外的组分所需的用量，在冰上将所有组分共同配制到同一管中制成混合物，彻底混匀，短暂离心。
3. 计算每个样本所需加入的cDNA模板的体积和所需补充的ddH<sub>2</sub>O的体积。如果每个样本所需的ddH<sub>2</sub>O体积都相同，可计算总体所需的ddH<sub>2</sub>O体积并加入到混合物中，彻底混匀。

试剂	1个20 μl体系 使用量	6个20 μl体系 使用量	11个20 μl体系 使用量	22个20 μl体系 使用量
2× SuperReal PreMix Plus	10 μl	60 μl	110 μl	220 μl
正向引物(10 μM)	0.6 μl	3.6 μl	6.6 μl	13.2 μl
反向引物(10 μM)	0.6 μl	3.6 μl	6.6 μl	13.2 μl
荧光探针(10 μM)	0.4 μl	2.4 μl	4.4 μl	8.8 μl
50× ROX Reference Dye	根据实际情况计算加入			
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	根据实际情况计算加入			

## Tips

5. 如需稀释模板，则按下表进行稀释配制。最终体系中稀释液浓度为 $1\times$ 。稀释液不是反应的必需组分。  
稀释液为黄色，预混试剂为蓝色，最终体系为绿色。

20 $\mu\text{l}$ PCR体系中稀释模板的添加量	1 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	2.5 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$
稀释模板中Dilution Buffer的浓度	20 $\times$	10 $\times$	8 $\times$	6.7 $\times$	5 $\times$	4 $\times$	3.3 $\times$
100 $\mu\text{l}$ 稀释模板中所需40 $\times$ Dilution Buffer的量	50 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	16.7 $\mu\text{l}$	12.5 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	8.4 $\mu\text{l}$
100 $\mu\text{l}$ 稀释模板中所需cDNA的量	50 $\mu\text{l}$	75 $\mu\text{l}$	80 $\mu\text{l}$	83.3 $\mu\text{l}$	87.5 $\mu\text{l}$	90 $\mu\text{l}$	91.6 $\mu\text{l}$

50 $\mu\text{l}$ PCR体系中稀释模板添加量	2 $\mu\text{l}$	2.5 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$
稀释模板中所需Dilution Buffer的浓度	25 $\times$	20 $\times$	16.7 $\times$	12.5 $\times$	10 $\times$	8.3 $\times$	6.25 $\times$
100 $\mu\text{l}$ 稀释模板中所需40 $\times$ Dilution Buffer的量	62.5 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	41.7 $\mu\text{l}$	31.3 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	20.8 $\mu\text{l}$	15.6 $\mu\text{l}$
100 $\mu\text{l}$ 稀释模板中所需cDNA的量	37.5 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	58.3 $\mu\text{l}$	68.7 $\mu\text{l}$	75 $\mu\text{l}$	79.2 $\mu\text{l}$	84.4 $\mu\text{l}$

6. 将混合物分装至每个检测管/孔中，按混合物—模板—ddH<sub>2</sub>O（如果需要）的顺序加样，配制体系，彻底混匀。



## Tips

使用预混Mix再分装的方法可以有效提高实验的重复性。配制和分装时请在冰上操作。

引物终浓度为0.3  $\mu\text{M}$ 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0.05-0.9  $\mu\text{M}$ 范围内调整。

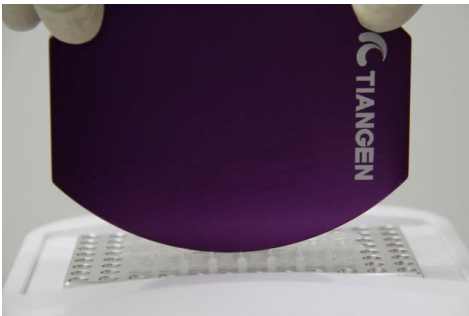
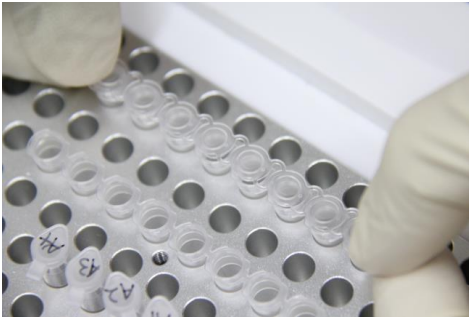
探针的浓度与使用的Real-Time PCR扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用说明进行。通常探针终浓度为0.2  $\mu\text{M}$ 可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。需要进一步优化探针浓度的，可以在0.1-0.5  $\mu\text{M}$ 范围内调整。



几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表：

仪器	终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/StepOne等	5 $\times$ （例如：5 $\mu\text{l}$ ROX/50 $\mu\text{l}$ 体系）
ABI 7500、7500 Fast、ViiA 7； Stratagene Mx3000P、Mx3005P和Mx4000等	1 $\times$ （例如：1 $\mu\text{l}$ ROX/50 $\mu\text{l}$ 体系）
Roche仪器，Bio-Rad仪器，Eppendorf仪器等	无需添加

## Step 3



使用八连排管时，体系配制分装完毕后，改好管盖，用压盖器压实。在管盖两端做好标记，不要标记在检测孔正上方的管盖上，以免影响荧光读数。

使用96孔板时，体系配制分装完毕后，使用封口膜封板，压实，在孔板四周或未加样的检测孔出标记。



## Step 4



使用微孔板离心机短暂离心96孔板或八连排管。注意管底朝向外侧，注意配平。  
离心八连排管时，将八连排管置于管架上，用固定片固定后进行离心。

# Step 5



阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C	15 min	预变性	否
PCR反应	40×	95°C	3 sec	变性	否
		60-66°C	20-32 sec	退火/延伸	是

将样本转移至荧光定量PCR仪，编好程序，开始qPCR反应。