

版本号: FP160815

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 (with SYBR Green I)	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

收到本产品后, 请立即置于-20 $^{\circ}$ C避光保存。从-20 $^{\circ}$ 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中添加了的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℃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-20℃), 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。

[△]几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表:

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

<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。

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, 几种常见仪器的时间设定见下表:

使用ABI 7700/7900HT/7500 Fast/ViiA 7, Roche, BioRad和Agilent等公司荧光定量PCR仪时, 请设定在15 sec。

使用ABI 7000和7300时请设定在31 sec。

使用ABI7500时请设定在32 sec。

^{△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。