

UltraSYBR Mixture

项目号: U665891 (5 mL)

U665891 (40 mL)

保存条件: -20°C, 如需频繁使用, 可存放于 2-8°C, 尽量避免反复冻融。

产品内容

| 组分 | U665891 5 ml | U665891 40 ml |
|---------------------|--------------|---------------|
| 2×UltraSYBR Mixture | 5×1 ml | 40×1 ml |
| ddH ₂ O | 5×1 ml | 40×1 ml |

产品简介

UltraSYBR Mixture 是专用于染料法 (SYBR Green I) 实时荧光定量 PCR 的预混体系, 浓度为 2×, 包含 GoldStar Taq DNA Polymerase、PCR Buffer、dNTPs、SYBR Green I 荧光染料和 Mg²⁺, 操作简单方便。主要用于基因组 DNA 靶序列和 RNA 反转录后 cDNA 靶序列的检测。

本品所含的荧光染料 SYBR Green I 可以与所有的双链 DNA 结合, 使该产品可用于不同靶序列的检测而不需合成特异性标记探针。其中 GoldStar Taq DNA Polymerase 是一种经化学修饰的、全新高效热启动酶, 在常温下没有聚合酶活性, 有效避免在常温条件下由引物和模板非特异性结合或引物二聚体而产生的非特异性扩增, 酶的激活须在 95°C 下孵育 10 分钟。独特的 PCR 缓冲体系与热启动酶的组合, 有效抑制了非特异性的 PCR 扩增, 显著提高了 PCR 的扩增效率。该产品适用于无需 ROX 作为校正染料的荧光定量 PCR 仪, 如: Roche LightCycler 480, Roche LightCycler 96, Bio-rad iCycler iQ, iQ5, CFX96。

产品特点

1. 本产品中使用了全新高效热启动酶 GoldStar Taq DNA Polymerase 与独特的 PCR 缓冲体系, 显著提高 PCR 的扩增效率, 具有高灵敏度和特异性强的特点。
2. 适用于荧光定量 PCR 检测, 能够准确地对目的基因进行定量和检测。

注意事项

1. 使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
2. 本产品中含有 SYBR Green I 荧光染料，保存本产品或配制 PCR 反应液时应避免强光照。
3. 避免反复冻融本品，反复冻融可能使产品性能下降。
4. 本品不能用于探针法荧光定量 PCR。
5. 配制反应液时，请使用新的或者无污染的枪头和离心管，尽量防止污染。

使用方法

以下举例为常规 PCR 反应体系和反应条件，实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

1. PCR 反应体系

| 试剂 | 50 μ L 反应体系 | 终浓度 |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 2 \times UltraSYBR Mixture | 25 μ L | 1 \times |
| Forward Primer, 10 μ M | 1 μ L | 0.2 μ M ¹⁾ |
| Reverse Primer, 10 μ M | 1 μ L | 0.2 μ M ¹⁾ |
| Template DNA | 2 μ l ²⁾ | / |
| ddH ₂ O | up to 50 μ l | / |

注意：

- 1) 通常引物浓度以 0.2 μ M 可得到较好结果，可以终浓度 0.1-1.0 μ M 作为设定范围的参考。
- 2) 通常 DNA 模板的量以 10-100 ng 基因组 DNA 或 1-10 ng cDNA 为参照，因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。
- 3) 推荐反应体系为 50 μ l，也可以根据实际实验需求按比例扩大或者缩小反应体系。

2. PCR 反应程序：

注意！本产品预变性反应必须在 95 $^{\circ}$ C 10 分钟下完成！

建议采用下表显示的两步法 PCR 进行程序设定，本程序是以 ABI7500 荧光定量 PCR 仪为例。若因 T_m 值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法 PCR 扩增，三步法操作步骤详见《反应条件的优化》。

| 步骤 | 温度 | 时间 | / |
|----------------------|------|----------------------|-----------|
| 预变性 | 95°C | 10 min ¹⁾ | / |
| 变性 | 95°C | 15 s | 35-40 个循环 |
| 退火/延伸 ²⁾ | 60°C | 1 min | 35-40 个循环 |
| 融解曲线分析 ³⁾ | / | / | / |
| / | 95°C | 15 s | / |
| / | 60°C | 1 min | / |
| / | 95°C | 15 s | / |
| / | 60°C | 15 s | / |

注意:

- 1) 本产品所采用的热启动酶须在预变性 95°C、10 min 条件下实现酶的活化。
- 2) 退火温度请以 60-64°C 作为设定范围的参考, 发生非特异性反应时, 可提高退火温度。
- 3) 本程序是以 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为参照设定, 融解曲线分析请以所使用的荧光定量 PCR 仪推荐的程序进行设定。

反应条件的优化

在荧光定量反应条件优化时, 应从引物浓度、退火温度、延伸时间等方面进行考虑, 以提高反应特异性和扩增效率。

1. 反应特异性和扩增效率高的实验体系应具备以下条件:

- 1) 反应特异性高: 阴性对照无引物二聚体等非特异性扩增; 不产生目的片段以外扩增。
- 2) 扩增效率高: Ct 值低; PCR 扩增效率高, 接近理论值 100%。

2. 反应条件优化方法:

- 1) 引物浓度: 通常引物浓度以 0.2 μM 可得到较好结果, 可以终浓度 0.1-1.0 μM 作为设定范围的参考。若提高反应特异性, 可降低引物浓度; 若提高扩增效率, 可增加引物的浓度, 由此优化反应体系。
- 2) 退火温度: 建议采用两步法 PCR, 退火温度 60°C 进行反应。若提高反应特异性, 可提高退火温度, 以 60-64°C 作为设定范围的参考。若因使用 T_m 值较低的引物等原因, 得不到良好的实验结果时, 可尝试进行三步法 PCR 扩增, 三步法的退火温度请以 56°C-64°C 的范围作为设定参考。
- 3) 延伸时间: 建议采用两步法 PCR, 延伸时间 1 min 进行反应。若提高扩增效率, 可尝试将延伸时间增加, 或尝试三步法 PCR

注意! 本产品预变性反应必须在 95°C 10 分钟下完成!

三步法荧光定量 PCR (本程序是以 ABI7500 荧光定量 PCR 仪为例):

上海阿拉丁生化科技股份有限公司

电话: 400-620-6333

| 步骤 | 温度 | 时间 | / |
|----------------------|----------------------|----------------------|-----------|
| 预变性 | 95℃ | 10 min ¹⁾ | / |
| 变性 | 95℃ | 10 s | 35-40 个循环 |
| 退火 | 56-64℃ ²⁾ | 30 s | 35-40 个循环 |
| 延伸 | 72℃ | 32 s ³⁾ | 35-40 个循环 |
| 融解曲线分析 ⁴⁾ | / | / | / |
| / | 95℃ | 15 s | / |
| / | 60℃ | 1 min | / |
| / | 95℃ | 15 s | / |
| / | 60℃ | 15 s | / |

注意：

- 1) 本产品所采用的热启动酶须在预变性 95℃、10 min 条件下实现酶的活化。
- 2) 无法得到理想的扩增效率时，适当降低退火温度；发生非特异性反应时，提高退火温度。
- 3) 若需提高反应扩增效率，可适当增加延伸时间。
- 4) 本程序是以 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为参照设定，融解曲线分析请以所使用的荧光定量 PCR 仪推荐的程序进行设定。