

M5 2X SYBR 防污染预混实时荧光定量 (含 ROX) 使用说明书

| 产品名称 | 单位 | 货号 |
|---------------------------------------|-------|----------|
| 2×RealStar Green Mixture UNG with ROX | 1ml | MF301-01 |
| 2×RealStar Green Mixture UNG with ROX | 5x1ml | MF301-05 |

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 12 个月。

【产品简介】

本产品是在 2×RealStar Green Mixture 基础之上，独特开发出的新型防污染荧光定量预混体系。产品含有优化浓度的 HotStart Taq DNA Polymerase、SYBR Green I、dATP、dUTP、dCTP、dGTP、UNG 酶（尿嘧啶 DNA 糖基化酶）、Mg²⁺、反应缓冲液和稳定剂等成分。本品在 PCR 反应中以 dUTP 代替 dTTP，扩增片段中的 T 部分被 U 取代，形成含 dU 碱基的 PCR 扩增产物，新添加的 UNG 酶可以降解反应体系中的含 U 的 DNA，有效消除 PCR 产物的残留污染，大大降低扩增产物污染导致的假阳性，从而保证扩增的特异性和准确性。本产品为 2×预混增强型荧光定量 PCR 反应体系，使用时只需加入模板、引物、ROX Reference Dye（用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，根据不同荧光定量 PCR 仪选择使用）和水，使其工作浓度为 1×，即可进行反应。具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点，可最大限度地减少人为误差、节约 PCR 实验操作时间、降低污染几率。

【产品组份】

| | | |
|---------------------------------------|-------------------|---------------------|
| 2×RealStar Green Mixture UNG with ROX | MF301-01 1.1ml | MF301-05 5x1.1ml |
|---------------------------------------|-------------------|---------------------|

【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. 尽可能减少 RealStar Green Mixture 在光下的暴露时间，长时间的曝光可导致荧光信号减弱。
3. 反应液的配制、分装请一定使用无污染的枪头、Microtube 等，尽量避免交叉污染。
4. 本品不能用于杂交探针法。

【操作示例】

户需自备的试剂：cDNA 或 DNA 模板、引物。请按照不同品牌荧光定量 PCR 仪的使用说明书要求进行实验操作。
操作示例：分别以 20μl PCR 反应体系为例

按下表配制 RT-PCR 反应体系：

| | |
|---------------------------------------|--------|
| 2×RealStar Green Mixture UNG with ROX | 10 μl |
| Primer 1 (10μM) | 0.4 μl |
| Primer 2 (10μM) | 0.4 μl |
| Template DNA | 0.4 μl |
| ddH ₂ O 补足至 | 20 μl |

注意：

- 1) 模板量：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。另外，two Step RT-PCR 反应的 cDNA（RT 反应液）作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。
- 2) 引物：通常引物浓度以 0.2 μM 可以得到较好结果，可以终浓度 0.1~1.0 μM 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。为了获得理想的 qPCR 的效果，扩增片段的长度建议为 80~200 bp。

3) 不同仪器所需 ROX Reference Dye 不同, 或需要添加或不需要添加, 请根据仪器说明进行操作。请严格按照各仪器推荐体系进行反应液配制。

【PCR 反应条件设置】

本制品中使用的 HotStart Taq DNA Polymerase 是利用抗 Taq 抗体封闭的 Hot Start DNA 聚合酶, 如果在 PCR 反应前进行模板的预变性, 通常设定为 95°C、2 min, 复杂或高 GC 模板适当延长至 5 min。该 DNA 聚合酶在 15 sec 内可完成至少 300 bp 的扩增, 可以满足绝大多数的 qPCR 实验; 对于超过 350 bp 或者高 GC 含量的扩增子, 建议增加延伸时间至 60 sec 或者采用三步法以提高扩增效率。

建议的 PCR 条件 (两步法):

| | |
|------------|-------------|
| 95°C 预变性 | 5 min. |
| 95°C 变性 | 2 min. |
| 95°C 变性 | 15 sec. |
| 60°C 退火/延伸 | 15-30 sec. |
| | 以上两步 40 个循环 |
| 溶解曲线 | 仪器自动设置 |

建议的 PCR 条件 (三步法):

| | |
|----------|-------------|
| 95°C 预变性 | 5 min. |
| 95°C 变性 | 2 min. |
| 95°C 变性 | 15 sec. |
| 60°C 退火 | 15-30 sec. |
| 72°C 延伸 | 30 sec. |
| | 以上三步 40 个循环 |
| 溶解曲线 | 仪器自动设置 |

注意: 以上举例为常规 qPCR 反应系统, 仅供参考。实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异, 需根据模板、引物、目的片段的特点设定最佳反应条件, 并根据比例放大或缩小反应体系。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。