

2xRealStar Green Fast Mixture

2x预混实时荧光定量快速 PCR 反应体系

【产品概述】

本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时荧光定量 PCR 的专用 2x 浓度增强型预混液。本产品含有优化浓度的 HotStart Taq DNA Polymerase、SYBR Green I、dNTPs、Mg²⁺、反应缓冲液和稳定剂等成分。主要用于基因组 DNA 靶序列和 RNA 反转录后 cDNA 靶序列的检测。HotStart Taq DNA Polymerase 高温加热前，抗 Taq 单克隆抗体与 Taq 结合，抑制 Taq 的聚合酶活性，从而抑制在低温条件下出现的由引物和模板 DNA 非特异性杂交或引物二聚体引起的非特异性扩增。抗体在 PCR 反应的预变性步骤中已完全失活，不会阻碍之后 Taq Polymerase 反应，大大提高了 PCR 反应的灵敏度及特异性。优化浓度的 SYBR Green I 荧光染料，特异性地掺入 DNA 双链后，荧光信号增强，而不掺入链中 SYBR Green I 染料分子荧光信号不变，从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步，荧光可以在退火或延伸阶段测定。

本产品为 2x 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 1x，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。

【产品规格及组分】

组分名称	A301-01	A301-05	A301-10
2 x RealStar Green Fast Mixture	1.1 ml x 1 支	1.1 ml x 5 支	1.1 ml x 10 支
*ROX Reference Dye/ROX Reference Dye II	44 µl	220 µl	220 µl x 2

**注：不同仪器所需 ROX Reference Dye 不同，如需添加，需致电本公司或向服务您的销售人员索取：
需加 ROX Reference Dye (50x)的机型:ABI Prism7000/7300/7700/7900HT 和 ABI Step One /ABI Step One Plus。
需加 ROX Reference Dye II (50x)的机型:ABI Prism7500 /7500 Fast , MJ Research Chromo4, Opticon (II) , Corbett Rotor Gene 3000 , Agilent Technologies Mx3000P。
无需加 ROX Reference Dye 的机型: Thermal Cycler Dice Real Time System , LightCycler , Smart Cycler System , Corbett Rotor-gene 6000 等荧光定量 PCR 仪。*

【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 Fast Mixture 在光下的曝露时间，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。

【保存条件】

-20°C 恒温避光保存一年，避免反复冻融。如果经常使用，可置于 4°C 保存至少三个月。

【使用方法】

用户需自备的试剂：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 20 µl 和 50 µl PCR 反应体系为例

1. PCR 反应体系的建立：

试剂	使用量	使用量	终浓度
DNA模板	0.4 µl	1 µl	*
正向引物 (10 µM)	0.4 µl	1 µl	0.2 µM**
反向引物 (10 µM)	0.4 µl	1 µl	0.2 µM**
2xRealStar Green Fast Mixture	10 µl	25 µl	1x
ROX Reference Dye (50x) or ROX Reference Dye II (50x) ***	0.4 µl	1 µl	1x
RNase-free H ₂ O	补足至 20µl	补足至 50µl	****

* 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%。

** 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。

*** 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。

**** 按照各仪器推荐体系进行反应液配制。

2. PCR 反应条件的设置：

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。

两步法 PCR 扩增标准程序：

95°C 2 min
95°C 15 sec
60°C 15~30 sec } 40 Cycles
溶解曲线（仪器自动设置）

三步法 PCR 扩增程序：

95°C 2 min
95°C 15 sec
60°C 15~30 sec
72°C 30 sec } 40 Cycles
溶解曲线（仪器自动设置）

注：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。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。