

版本号: FP170801

RealUniversal Color PreMix(SYBR Green)

RealUniversal 彩色荧光定量预混试剂 (SYBR Green)

目录号: FP201

产品内容

产品组成	FP201-01 20 μ l \times 125 rxn	FP201-02 20 μ l \times 500 rxn	FP201-03 20 μ l \times 5000 rxn
2 \times RealUniversal PreMix (with SYBR Green I and blue dye)	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
40 \times Dilution Buffer (Yellow)	1.25 ml	1.25 ml	10 \times 1.25 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2 \times 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 RealUniversal PreMix和50 \times 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。2 \times RealUniversal PreMix中预先混有Real Time PCR反应所需的酶、dNTP等所有组分以及最适浓度的SYBR Green I, 并且额外添加了蓝色指示剂。试剂盒中还提供了黄色的样本稀释液, 利于大量样品的稀释和加样, 减少误操作概率。

本产品采用了高效的化学修饰的HotStar Taq DNA聚合酶, 配合精心优化buffer体系, 具有高扩增效率, 高扩增特异性和宽广的可信范围的特点, 对于不同来源、不同丰度的目的基因都具有良好的适应性和准确的定量结果。

试剂盒特点

1. 2×RealUniversal PreMix采用了高效的化学修饰的HotStar Taq DNA聚合酶，并且精心优化了buffer体系，平衡了K⁺和NH₄⁺的比例，从而具有高扩增效率，高扩增特异性和宽广的可信范围的特点。
2. RealUniversal PreMix中预混有SYBR Green I，PCR反应液配制时，只需加入模板、引物、无核酸酶超纯水便可进行Real Time PCR反应，操作简单方便。
3. 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。
4. 添加颜色指示剂，令加样更加简便，有效降低误操作概率。

试剂盒原理

本产品中使用了HotStar Taq DNA聚合酶，其活性经过95℃条件下孵育15 min来激活，并且在进入PCR循环后，每经过一轮95℃条件下变性，即可重新激活一部分HotStar Taq DNA聚合酶，从而在整体反应过程中维持了酶活的稳定和扩增的高效。体系中使用了优化配比的K⁺和NH₄⁺的缓冲体系，提高反应的专一性，实验重复性好。

此外，在2×RealUniversal PreMix中添加了蓝色指示剂，试剂盒中还单独配有带有黄色指示剂的模板稀释液，适合于白色或无色的PCR管/孔板中观察，特别适合于配制大量体系（如384孔板实验）时使用，根据体系颜色即可直观判断每一个体系是否配制完整。两种指示剂的颜色均不会对SYBR Green的定量造成干扰，结果准确可靠。

注意事项

1. PCR反应液中各颜色指示剂的终浓度应为1×，请根据模板的添加量计算Dilution Buffer的用量。
 2. 模板浓度较低或实验有需要时，可直接用cDNA原液作为模板使用。不使用模板稀释液不会影响定量结果。
 3. PCR反应的预变性条件必须设定为95℃ 15 min，用以充分激活聚合酶。
 4. 本产品中含有荧光染料SYBR Green I，保存本产品或配制PCR反应液时应避免强光照射。
 5. 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，请不要使用涡旋仪进行混匀，尽量避免出现泡沫，并经瞬时离心后使用。
 6. 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。
 7. 20 μl反应体系中，基因组DNA或cDNA模板的使用量一般小于100 ng，反转录产物作为模板时，使用量应不超过PCR体系终体积的10%。
-

操作方法

<1> 建立Real-Time PCR反应体系

请注意将2× RealUniversal PreMix和50× ROX Reference Dye避光保存。

1. 解冻2× RealUniversal PreMix, 50× ROX Reference Dye, 模板, 引物, 40× Dilution Buffer和RNase-Free ddH₂O(如果保存在-20℃), 并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀。
2. 建议置于冰上进行Real Time PCR反应液的配制。

40× Dilution Buffer为黄色, 2× RealUniversal PreMix为蓝色。如需稀释模板, 则最终反应体系应为绿色; 否则应为蓝色。如颜色不符, 请检查体系中是否正确加入相关组分。

反应体系:

组成成分	50 μl 体系	25 μl 体系	20 μl 体系	终浓度
2× RealUniversal 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。

[▲] 如需稀释模板, 应先将cDNA模板与40× Dilution Buffer按一定比例混合成稀释模板。在定量体系中Dilution Buffer的终浓度为1×。

[△] 几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表:

仪器	终浓度
ABI 5700/7000/7300/7700/7900HT/ StepOne™/ StepOne Plus™	5×(例如: 5 μl ROX/50 μl体系)
ABI 7500、7500 Fast、ViiA 7、QuantStudio™、 12K Flex; Agilent Mx3000P、Mx3005P和Mx4000	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。当出现模板浓度过低引起非特异扩增，引物T_m值较低导致的扩增效率低下或扩增曲线重现性不佳等现象时，建议尝试进行三步法PCR扩增反应。

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	15 min	预变性	否
PCR反应	40 ×	95°C	10 sec	变性	否
		60-66°C ^{▲1}	20-32 sec*	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	15 min	预变性	否
PCR反应	40 ×	95°C	10 sec	变性	否
		50-60°C ^{▲2}	20 sec	退火	否
		72°C	20-32 sec*	延伸	是
		熔解曲线分析(Melting/Dissociation Curve Stage)			

^{▲1} 先使用60°C退火温度进行扩增。如果需要进一步优化，可以尝试在60-66°C 范围内进行。

^{▲2} 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，则可以适当减低退火温度。

* 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：

使用时Roche LightCycler/ LightCycler 480请设定在20 sec。

使用ABI 7500 Fast/7900HT/7900HT Fast/ViiA 7/StepOne/StepOnePlus时请设定在30 sec。

使用ABI 7000和7300时请设定在31 sec。

使用ABI 7500时请设定在32 sec。

- 盖上反应管，轻柔混匀。可短暂离心，确保所有组分均在管底。
- 将反应体系置于荧光定量PCR仪中，开始反应。