



FastSYBR Mixture

目录号：CW0955M CW2621M CW2622M (5 ml)

保存条件：-20℃，如需频繁使用，可存放于2-8℃，尽量避免反复冻融。

产品内容

Component	CW0955M 5 ml	CW2621M 5 ml	CW2622M 5 ml
2×FastSYBR Mixture	5×1 ml	5×1 ml	5×1 ml
50×Low ROX	-	200 μl	-
50×High ROX	-	-	200 μl
ddH ₂ O	5×1 ml	5×1 ml	5×1 ml

产品简介

FastSYBR 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2x,包含Fast 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反转录后的cDNA靶序列检测。本品所含荧光染料SYBR Green I可以与所有的双链DNA相结合,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。本品含有的Fast Taq DNA Polymerase能有效减少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,酶的激活仅需在95℃孵育20s。整个PCR反应过程比普通反应可节省约40分钟,大大缩短了PCR的反应时间。独特的PCR缓冲体系与热启动酶的组合,有效抑制了非特异产物的产生,并显著提高PCR的扩增效率。该产品应用范围广,适用于普通和快速定量PCR程序。

ROX染料用于校正定量PCR仪孔与孔之间产生的荧光信号误差,一般用于ABI、Stratagene等公司的Real Time PCR 扩增仪。不同仪器的激发光学系统有所不同,因此ROX染料的浓度必须与相应的荧光定量PCR仪相匹配。

不需要ROX校正的仪器 (CW0955) :

Roche LightCycler 480, Roche LightCycler 96, Bio-rad iCycler iQ, iQ5, CFX96等。

需要Low ROX校正的仪器 (CW2621) :

ABI Prism7500/7500 Fast, QuantStudio® 3 System, QuantStudio® 5 System, QuantStudio® 6 Flex System, QuantStudio® 7 Flex System, ViiA 7 system, Stratagene Mx3000/Mx3005P, Corbett Rotor Gene 3000等。

需要High ROX校正的仪器 (CW2622) :

ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One/Step One Plus等。

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。
3. 避免反复冻融本品,反复冻融可能使产品性能下降。本产品长期保存可置于-20℃,避光。如果在短期内需要频繁使用,可在2-8℃保存。
4. 本品不能用于探针法荧光定量PCR。

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 FastSYBR 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⁾	
50 \times Low ROX or High ROX (optional) ³⁾	1 μ l	1 \times
ddH ₂ O	up to 50 μ l	

注意：1) 通常引物浓度以0.2 μ M可以得到较好结果，可以在0.1-1.0 μ M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。

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) 不同仪器的激发光学系统有所不同，根据使用荧光定量的仪器选择加入50 \times Low ROX or 50 \times High ROX。

2. PCR反应条件

步骤	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}$ C	20 s ¹⁾
变性	95 $^{\circ}$ C	3 s
退火/延伸 ²⁾	60 $^{\circ}$ C	30 s
融解曲线分析 ³⁾	95 $^{\circ}$ C	15 s
	60 $^{\circ}$ C	1 min
	95 $^{\circ}$ C	15 s
	60 $^{\circ}$ C	15 s

注意：1) 本产品所采用的酶须在预变性95 $^{\circ}$ C、20s条件下实现酶的活化。在此条件下，大多数模板可良好的进行解链。对GC含量高、二级结构复杂的模板，可将预变性时间延长至1分钟，以使起始模板充分解链。若高温处理时间过长，会对酶的活性造成影响。可根据模板情况确定最佳的预变性时间。

2) 建议采用两步法PCR反应程序，退火温度请以60-64 $^{\circ}$ 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。若因使用Tm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，退火温度请以56 $^{\circ}$ C-64 $^{\circ}$ C的范围作为设定参考。

3) 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，本程序是以ABI 7500荧光定量PCR仪为参照设定。