

TQ2300 SYBR Green qPCR master mix 简易中文步骤

运输和储存

试剂盒组分在 2-8°C 运输，可长期保存在 -20°C 中。试剂盒溶液和 ROX 参比染料都应尽可能避免直射光的照射，长时间暴露在直射光下可能导致荧光信号的丢失。

简介

Omega Bio-Tek 的 perfectstart SYBR Green qPCR master mix 经过优化，可在定时定量 PCR (qPCR) 中扩增和检测 DNA。这是一种即用型混合物，含有除了引物和模板之外的其它所有组分。它结合了化学修饰“热反应”版本的 Taq DNA 聚合酶和新型荧光染料，在靶序列的定量方面具有非常高的灵敏度，在很大的目标浓度范围内具有线性剂量响应。反应体积通常为 100 或 400 个扩增反应的量，每个扩增反应 25 μ l。

Omega Bio-Tek 的 perfectstart SYBR Green qPCR 主混合物以 2 \times 浓度提供，含有“热反应” Taq DNA 聚合酶，SYBR Green I 荧光染料，Mg²⁺，dNTPs 和稳定剂。该混合剂可以处理少于 10 拷贝的靶基因，有广泛的动态范围，与溶解曲线分析兼容。

- 主混合物中的 SYBR Green I 染料荧光双链 DNA 结合染料，提供了更高的灵敏度和低 PCR 抑制环境。
- 主混合物中的 Taq DNA 聚合酶经过化学修饰来阻断聚合酶在室温下的活性，允许在室温下操作，长期保存可置于 4°C。在 PCR 循环中，孵育 10min 后恢复活性，提供自动热启动以提高灵敏度，特异性和产量。
- ROX 参考染料作为兼容的仪器反应之间的荧光信号标准化的单独组分，可以调节反应之间荧光波动的非 PCR 相关波动，并在多重反应中提供稳定的基线，可根据需要在加入 qPCR 时调整 50 \times Rox 的加入体积。

试剂盒组分

货号	TQ2300-01	TQ2300-02
反应次数	100 次	400 次
2 \times perfectstart SYBR Green qPCR master mix	1.25mL	1.25mL \times 4
50 \times ROX Reference Dye	50 μ l	200 μ l

重要参数

仪器的选择:

该试剂盒可与各种实时仪器一起使用，包括但不限于 ABI 7300 和 7500 实时 PCR 系统; Bio-Rad iCycler; Stratagene Mx3000P; MJ research Chromo 4 实时探测器。最佳循环条件会因不同仪器而有所差异。

模板:

cDNA

- 对于两步法 qRT-PCR, 使用由不多于 1 μ g 总 RNA 逆转录而成的稀释或未稀释的 cDNA。推荐使用 Omega Bio-Tek 的 M-MLV First Strand cDNA Synthesis Kit 进行 cDNA 合成。
- 未稀释的 cDNA 模板可占不多于 10%的 qPCR 体积。
- 注意, 测定未稀释的 cDNA 时, 模板中含有的高丰度基因组可能导致 qPCR 定量准确性降低。对 cDNA 模板进行梯度稀释可便于获得最准确结果。

质粒和基因组 DNA

在 10 μ l 反应体积中可使用不多于 100ng 的基因组 DNA 或 10-10⁷ 拷贝数的质粒 DNA。

引物

使用 Omega Bio-Tek 的 perfectstart SYBR Green qPCR master mix 时, 引物设计是最重要的参数之一。设计引物时, 扩增子的长度应约为 80-250 bp。对大多数反应适宜的每种引物的最终浓度为 400nM, 最佳结果可能需要滴定 100 至 600 nM 的引物浓度。

DNA 聚合酶活化时间

在开始 PCR 循环前, 热反应 DNA 聚合酶在 95 $^{\circ}$ C 孵育 10min 后被活化。

融化曲线分析

融化曲线分析始终在实时 qPCR 后进行, 用于确定引物二聚体的存在并分析反应的特异性。使用特定仪器的附带说明书对仪器进行编程进行融化曲线分析。

操作步骤

按照以下操作, 在 ABI 实时仪器上进行 qPCR, 请注意 ABI 7300 所需的 ROX 参考染料量较低。该用量也可当作其他实时仪器的最小用量。

1. 设置实时 PCR 仪器如下: (最佳温度和孵育时间可能存在差异)

95 $^{\circ}$ C 10min (激活 DNA 聚合酶)

40-45 个循环: Step 1: 95 $^{\circ}$ C 15s

Step 2: 55-60 $^{\circ}$ C 20s

Step 3: 72 $^{\circ}$ C 20s

Step1 ~ 3 称为一个循环。

溶解曲线分析数据：根据仪器中的文档。

2. 对于每个反应，将以下物质加入 0.2mL 的微量离心管或 PCR 板的每个孔中。下表为一个标准 25 μ l 反应体系，组分的加入量可根据需要进行调整。对于多个反应，可先准备一套通用组分的混合液，在每个离心管或板上分装入适当的体积，再分别加入不同的组分（如引物、模板）。

Component	Single rxn	Final conc.
2 \times perfectstart SYBR Green qPCR master mix	12.5 μ l	1 \times
正向引物 , 10 μ M	1 μ l	400 nM
反向引物 , 10 μ M	1 μ l	400 nM
ROX 参考染料 (可选)	0.5 μ l /0.05 μ l	
模板	2-5 μ l	
DEPC-treated water	To 25 μ l	

3. 盖上或密封离心管/ PCR 板，轻轻混匀。确保所有组分都位于管/板的底部；如果需要，可以短暂离心

4. 按步骤 1 程序进行实验，收集数据并分析结果。

中文翻译仅供辅助阅读，详情请以英文说明书为准