



2×RealStar Fast SYBR qPCR Mix (UNG)

2×RealStar Fast 染料法 qPCR 预混液 (UNG)

版本号: V240701

货号: A302
保存: -20°C避光
运输: 低温

货号	规格
A302-01	1.1 ml
A302-05	1.1 ml×5
A302-10	1.1 ml×10

【产品概述】

本产品是在 2×RealStar Fast SYBR qPCR Mix (Cat#A301) 基础之上, 通过添加优化比例的 dUTP 和 UNG 酶而开发出的新型防污染荧光定量预混体系。本产品含有优化浓度的 GenStar Fast HSTaq DNA Polymerase、SYBR Green I、dNTPs、dUTP、UNG 酶 (尿嘧啶 DNA 糖基化酶)、Mg²⁺、反应缓冲液和稳定剂等成分。在 PCR 反应中以 dUTP 代替 dTTP, 扩增产物片段中的 T 被 U 取代, 形成含 dU 碱基的 PCR 扩增产物, 而高活性的 UNG 酶可以快速降解反应体系中的含 U 的 DNA 片段, 有效消除环境中 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×防污染预混实时荧光定量快速 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、降低污染机率。

【产品组分】

组分货号	组分名称	A302-01	A302-05	A302-10
ZA302-101	2×RealStar Fast SYBR qPCR Mix (UNG)	1.1 ml	1.1 ml×5	1.1 ml×10
ZA320-101	High ROX Reference Dye	44 µl	220 µl	440 µl
ZA321-101	Low ROX Reference Dye	44 µl	220 µl	440 µl

注: 不同仪器所需 ROX Reference Dye 不同:

需加 High ROX Reference Dye (50×) 的机型: ABI Prism7000/7300/7700/7900HT 和 ABI Step One /ABI Step One Plus。

需加 Low ROX Reference Dye (50×) 的机型: ABI Prism7500/7500 Fast, MJ Research Chromo4, Opticon (II), Corbett Rotor Gene 3000。

无需加 ROX Reference Dye 的机型: Thermal Cycler Dice Real Time System, LightCycler, Smart Cycler System, Corbett Rotor-gene 6000, Agilent Technologies Mx3000P 等荧光定量 PCR 仪。

【保存条件】

-20°C避光保存, 保质期 24 个月, 避免反复冻融。如果经常使用, 可置于 4°C保存至少 3 个月。

【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 2×RealStar Fast SYBR qPCR Mix (UNG) 在光下的曝露时间, 长时间的曝露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气枪头、Microtube 等, 尽量避免交叉污染。
4. 本品不能用于杂交探针法。

【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:

组分	20 μ l体系	50 μ l体系
DNA模板 ^a	1 μ l	1 μ l
正向引物 (10 μ M) ^b	0.5 μ l	1 μ l
反向引物 (10 μ M) ^b	0.5 μ l	1 μ l
2 \times RealStar Fast SYBR qPCR Mix (UNG)	10 μ l	25 μ l
High/Low ROX Reference Dye ^c	0.4 μ l	1 μ l
Sterile Water	补足至20 μ l	补足至50 μ l

^a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%。

^b引物: 通常引物浓度以0.2 μ M可以得到较好结果, 可以终浓度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。为了获得理想的qPCR的效果, 扩增片段的长度建议为80-200 bp。

^c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。

2. PCR 反应条件的设置:

两步法 PCR 扩增程序

流程	温度	时间 (参考范围)	循环数
UNG 酶处理	50 $^{\circ}$ C	5 min	
预变性	95 $^{\circ}$ C	2 min (30 s-5 min) ^d	
变性	95 $^{\circ}$ C	10 s (3 s-15 s) ^e	40
退火/延伸	60 $^{\circ}$ C ^f	30 s (10 s-40 s) ^g	

溶解曲线 (仪器自动设置)

^d预变性时间: 标准程序选择 2 min, 适合大多数模板; 快速程序最短可选择 30 s; 复杂或高 GC 模板, 可适当延长预变性时间至 5 min。

^e变性时间: 标准程序 10 s; 快速程序最短可选择 3 s;

^f退火/延伸温度: 对于复杂模板、高 GC 含量的扩增子, 建议增加退火和延伸温度至 68 $^{\circ}$ C。

^g退火/延伸时间: 标准程序 30 s, 可以满足绝大多数的 qPCR 实验; 对 200 bp 以内的扩增子, 延伸时间最短可设置为 10 s; 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 40 s 或者采用三步法以提高扩增效率。

三步法 PCR 扩增程序

流程	温度	时间	循环数
UNG 酶处理	50 $^{\circ}$ C	5 min	
预变性	95 $^{\circ}$ C	2 min	
变性	95 $^{\circ}$ C	15 s	40
退火	60 $^{\circ}$ C	15-30 s	
延伸	72 $^{\circ}$ C	30 s	

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。

3. 在相应的 real time PCR 仪器上完成实验, 并分析结果。

【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。