天净沙系列

CAT#:990408-1

低温运输，-20℃保存

天净沙

2×染料法 qPCR MasterMix

2×SYBR qPCR MasterMix

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是基于荧光染料检测的即用型 PCR 试剂盒，可以对靶片段进行实时定量 PCR 分析。产品含有经过优化的缓冲液组分、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、$MgCl_2$ 及 SYBR Green I 等所有实时定量 PCR 所需要的成分，用户只需加入模板和引物即可进行实时定量 PCR 反应，具有广泛的用途。本产品具有下列特点：，

1. 方便，用户只需准备模板和引物即可以进行实时定量 PCR 实验。
2. 产品为 2×预配液，操作步骤已经最大限度地简化，能减少污染，降低实验误差。
3. 扩增效率和灵敏度更高。
4. 快捷，即用型的预配液使加样操作步骤简化，避免了交叉污染，降低实验误差。
5. 各成分的浓度和比例都经过精心优化，反应的灵敏度高，特异性强。。
6. 本规格有 1 mL，足够 100 次 20 μL 体系的染料法荧光定量 PCR。
7. 本产品只供科研使用。

规格及成分

本产品采用 logo 热封袋包装

成份	编号	规格	包装
2×染料法 qPCR MasterMix	990408	1 mL	1 mL 本色管
使用手册	990408sc	1 份	1 份

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

DNA 模板、引物、超纯水。

使用方法

1. 如果有 N 个样品（最好含一个样本制备阳性对照和一个样本制备阴性对照）并且做定量分析，最好设置 N+7 个反应，多出的 7 个中，6 个用于 6 点标准曲线，一个是扩增阴性对照（NC）。在 N+7 个 PCR 管中，加入下列成分。如果是做定性分析，则 6 个做标准曲线的样品缩减成一个扩增阳性对照（PC），用户自己需要根据下表进行适当修改（把 6 个标曲反应改成 1 个阳性对照反应）。

成分	N 个样品管	6 个标准曲线管	NC 管
2×染料法 qPCR MasterMix	各 10 μL	各 10 μL	10 μL
自备引物 1（10 μM）	各 1 μL	各 1 μL	1 μL
自备引物 2（10 μM）	各 1 μL	各 1 μL	1 μL
自备模板 DNA			
基因组 DNA	10-100 ng	不加	不加
或 cDNA	1-10 ng	不加	不加
自备阳性对照模板（6 各梯度）	不加	各 1 μL	不加
阴性对照模板(一般用水)	不加	不加	1 μL

自备 50×自备 ROX I 或 ROX II 染料(见附)	各 0.4 μL	各 0.4 μL	0.4 μL
补超纯水到	20 μL	20 μL	20 μL

2. 放入荧光 PCR 仪中进行扩增，下表的扩增参数仅供参考。

循环步骤	反应参数	备注
预变性	95℃ 5 分钟	
PCR (35-45 次循环)	94℃ 10 秒	
	55-65℃ 15-30 秒	靶分子长度最好在 80-200bp
	72℃ 40 秒	(采集 SYBR 通道的荧光信号)
溶解曲线分析	按 qPCR 仪器手册执行	

3. 通过溶解曲线分析的结果排除无效数据。有 Ct 值，但 Tm 值跟扩增阳性对照 Tm 不一样的样品（包括对照和待测样品），归为假阳性，数据无效，不予以分析。Tm 跟扩增阳性对照 Tm 一致的，为有效 Ct。
4. 如果两种阴性对照（样本制备阴性对照和扩增阴性对照）的溶解曲线所得 Tm 值跟扩增阳性对照的 Tm 值一样，说明环境或试剂可能有过去的 PCR 扩增产物污染，则此次实验无效，需要解决污染问题再进行实验。
5. 如果两种阴性对照（样品制备阴性对照和 PCR 阴性对照）是假阳性，可以继续分析其它样品有效数据。
6. 对定量检测，以 6 个标准曲线样品的浓度的 log 值为横轴，以有效 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的有效 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再换算出待测样品的 DNA 浓度。
7. 对定性检测，则得到有效 Ct 值的样本为阳性，无有效 Ct 值的为阴性。

附:

下列信息仅供参考，具体以 qPCR 仪器的使用手册为准。

1. 不需要 ROX 的机型：Agilent MX3000 和 MX4000、iCycler IQ、LightCycler 480、Smart Cycler System、Thermal Cycler Dice Real Time System 等型号的荧光 PCR 仪器不需要加 ROX 染料，但加入的话也不会影响整个 PCR 分析。
2. 需要使用 ROX I 的机型：ABI Prism7000、7300、7700、7900HT、Step One、Step One Plus。
3. 需要使用 ROX II 的机型：ABI Prism7500、7500 Fast、MJ Opticon、MJ Chromo4、Corbett RotorGene 3000。

关联产品	2×探针法 qPCR MasterMix