

產品名稱&產品編碼

產品名稱: Sybr Green Premix No rox
產品編碼: S008
產品名稱: Sybr Green Premix Low rox
產品編碼: S009
產品名稱: Sybr Green Premix High rox
產品編碼: S010

產品說明

本试剂盒采用荧光染料 SYBR green I 嵌入荧光法进行实时荧光定量扩扩增(Real time-PCR)的组合试剂。该试剂已将 Real Time PCR 所需要的高温聚合酶, 反应缓冲, dNTP, SYBR Green I 等试剂优化组合到一起。 Smart Cycler System, Line-Gene, Light Cycler 等。 Roche, Bio-Rad, Ceheid, Corbett Research, Eppendorf 公司生产的荧光定量 PCR 仪, 不需要 ROX REFERENCE DYE; ABI 公司生产的 PRISM 系列需要 ROX 染料。

用途

用于基于 SYBR green I Real Time PCR 法, 对目的基因进行快速的检测和定量。

使用范例

1. 根据仪器说明, 准备好模板梯度, 做标准曲线用, 浓度一般可以从 0.05fg/ul 到 500pg/ul, 根据摸索, 不同 PCR 仪灵敏度不同; 样品可以 RT-PCR 的产物的产物, 不需要对 RT-PCR 的产物进行纯化。
2. 从-20 度取出 Sybr Green Premix, 溶化后置于冰里。
3. 在特定反应管 (或 96 孔板) 中依次加入

Sybr Green Premix	12.5ul
PCR Forward Primer (10uM)	0.5ul
PCR Reverse Primer (10uM)	0.5ul
DNA Template	2ul
H2O	9.5ul
总体积为25ul	

说明: 用2ul水代替模板, 做空白对照

4. PCR反应条件如下:

两步法建议条件:

温度	时间	循环数
95度	30秒	1个循环
95度	10秒	35-45个循环
60度	30秒	

如果退火温度低于60度, 则建议用三步法, 三步法建议条件:

温度	时间	循环数
95度	2分钟	1个循环
95度	20秒	35-45个循环
50-60度	20秒	
72度	35秒	

注意: 以上均为建议条件, 最佳条件需客户根据模板和引物情况自行调整。

5. 分析 Real Time PCR 的扩增曲线和融解曲线 (参见仪器说明书)。
6. 制作标准曲线, 对未知样品进行定量 (参见仪器说明书)

Real Time PCR 引物设计的几个参考原则

扩增产物要特异, 长度在60-200bp为佳
引物: 18-30bp; GC%: 40-60%; 保持相近的Tm;
Tm在60-68度;
3端避免2个以上碱基互补; 避免为T; 避免连续3个G或C;
引物的扩增效果用Agarose电泳检测特异性。

保存条件

-20度