

TruQuant SYBR Green 预混液

FB05001010	100 次反应	1 mL
FB05001050	500 次反应	5 mL
FB05001510	500 次反应	5 x 1 mL

存储条件: -25°C 至 -15°C, 避光保存

TruQuant SYBR Green 预混液是一款 2X 即用型预混液。该产品专为通过实时荧光定量 PCR 对 cDNA 和基因组 DNA (gDNA) 模板中的 DNA 靶标进行染料法定量扩增而设计, 适用于多种复杂模板和靶标, 并兼容解链温度 (T_m) 在 55°C 至 65°C 范围内的多种引物。

反应体系配制

每次反应使用 1-10 ng cDNA 或 10-100 ng gDNA。不推荐使用体积小于 10 μ L 的反应体系。推荐引物的最终浓度为 400 nM, 引物解链温度 T_m 为 60°C。建议每个样本重复四次。

组分	10 μ L 反应体系	20 μ L 反应体系	最终浓度
2X TruQuant SYBR Green 预混液*	5 μ L	10 μ L	1X
正向引物和反向引物	0.5 μ L	1 μ L	400 nM
模板 DNA	1 μ L	2 μ L	0.5 ng/ μ L
无核酸酶水	补齐至 10 μ L	补齐至 20 μ L	-

* 4°C 保存时, 预混液可稳定 4 个月。-20°C 保存时, ≤ 20 次的冻融循环不会影响预混液的性能。

- 根据所需反应次数, 按比例加入各组分, 以制备反应预混液, 且每种组分需预留 10% 的余量, 以防止在移液过程中出现损失。
- 将所有组分充分混匀后快速离心。

仅供研究使用。不可用于诊断程序。

- 将反应混合液转移至反应板的孔中。
- 用化学膜覆盖反应板。
- 对反应板进行快速离心。

配制好的 qPCR 反应板若避光保存, 可在室温下保存长达 8 小时。

仪器: 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 系统、7500 实时荧光定量 PCR 系统、7900HT Fast 实时荧光定量 PCR 系统、7900HT 实时荧光定量 PCR 系统、QuantStudio 3 实时荧光定量 PCR 系统以及 QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 系统。

循环条件

- 设置热循环程序

步骤	温度	快速反应时间	标准反应时间	循环次数
酶活化	95°C	2 分钟	2 分钟	1
变性	95°C	5 秒	15 秒	40
退火与延伸	60°C	30 秒	60 秒	

注意: 该预混液中的尿嘧啶-DNA 糖基化酶 (UDG) 是热敏型 UDG。在 qPCR 反应板的制备过程中, 含 dU 的 DNA 已被消化, 因此, 无需在热循环程序中设置 UDG 步骤。热敏型 UDG 会在最初 95°C/2 分钟 步骤中失活。

- 设置熔解曲线程序

步骤	快速升温速率 (°C/秒)	标准升温速率 (°C/秒)	温度	时间
1	1.99	1.6	95°C	15 秒
2	1.77	1.6	60°C	1 分钟
3 (熔解曲线)	0.075	0.075	95°C	15 秒

对于 7500 实时荧光定量 PCR 系统，请使用默认升温速率。

3. 设置选项

- 实验类型：标准曲线
- 试剂：SYBR™ Green 试剂
- 荧光报告基团染料：SYBR™ Green
- 淬灭基团染料：无
- 被动参比染料：ROX™
- 升温速度：标准或快速（选择与步骤 2 相同的设置）
- 熔解曲线升温增量：连续

结果分析

1. 观察扩增曲线。
2. 使用仪器软件设置合适的基线和阈值。
3. 通过熔解曲线检查是否存在非特异性扩增。
4. 进行相对定量或绝对定量分析。