



# QuantFast SYBR Green

## qPCR SuperMix

Magicbio # M221



## 产品简介

QuantFast SYBR Green qPCR SuperMix应用包括 SYBR Green I 荧光染料和方便即用的 SuperMix 配方，可对目标cDNA进行快速、特异性的定量检测。优化的预混液可缩短real-time PCR 反应时间，适用于标准或快速PCR仪。即用型预混液中的热启动酶和独特的PCR缓冲液可确保在所有real-time PCR仪上进行灵敏的qPCR，无需优化。

## 试剂盒组分

组分	M2211(20 $\mu$ l x 500次)	M2212(20 $\mu$ l x 5000次)
QuantFast SYBR Green qPCR SuperMix	5 ml	50 ml
50x ROX Dye	1 ml	10 ml
Nuclease-Free Water	5 ml	50 ml

**保存条件** -20 $^{\circ}$ C保存

## 试剂盒原理

QuantFast SYBR Green qPCR SuperMix可在大范围内进行特异性、灵敏的检测，适用于标准和快速PCR仪。特制的快速PCR缓冲液，可大大缩短变性、退火和延伸时间，对复杂的模板、PCR抑制剂残留较多的模板（如土壤和粪便DNA）以及长片段扩增等具有较好的适用性。此外，HotStarTaq DNA Polymerase必须要在95 $^{\circ}$ C加热3分钟才能活化，需要严格的热启动，可避免生成非特异性产物。

成分	特点	优势
HotStarTaq DNA Polymerase	95 $^{\circ}$ C 3分钟活化	在室温进行qPCR反应体系构建
QuantFast SYBR Green PCR Buffer	独特的qPCR Buffer体系可确保本产品所有的Real-Time PCR仪上进行高灵敏的快速qPCR反应	qPCR运行时间缩短50%，更快获得结果，一天内可完成更多PCR反应
SYBR Green I 染料	与DNA双链结合时产生强荧光信号	高灵敏度扩增，SuperMix配方中的SYBR Green I 染料可检测出低至10拷贝的目的基因及1 pg模板DNA或RNA，动态范围高达6个数量级，适合溶解曲线分析
ROX染料	对ABI和Agilent等PCR仪进行荧光信号的校准	对需要ROX染料的qPCR仪进行校准，不影响PCR反应结果

## 试剂盒特点

1. 快速获得结果，可节省多达50%的时间
2. 可特异性检测低拷贝数的模板
3. 准确检测各种起始量的模板
4. 优化的即用型预混液用于快速PCR反应
5. 通用的操作流程适用于标准和快速PCR仪

## 试剂盒应用

QuantFast SYBR Green PCR Kits可用于cDNA的基因表达分析，质粒、gDNA以及测序文库的绝对定量分析，适用于各种real-time PCR仪，包括ABI、Bio-Rad、Eppendorf、Roche和Agilent的PCR仪。

## 注意事项

### 模板 cDNA

对于两步法定量 qPCR，使用从 10pg 到-1 $\mu$ g 总 RNA 中逆转录的 5 $\mu$ l 未稀释的或 10 $\mu$ l 稀释的 cDNA。20 $\mu$ l 反应体系中，cDNA 模板的使用量一般不超过 100ng，, 需注意，当检测未稀释的 cDNA 中高丰度基因时，可能会导致定量 PCR 结果中 Ct 值过低，从而影响定量的准确性。将 cDNA 模板进行梯度稀释可以获得更准确的结果。

### 质粒和基因组 DNA

在 20 $\mu$ l 体系里可使用 100pg 至 1 $\mu$ g 量的基因组 DNA 或 10-107 拷贝量的质粒 DNA。注意，1  $\mu$ g 质粒 DNA 中含有的拷贝数等于  $9.1 \times 10^{11}$  除以该质粒的 kb 数。

### ROX 参考染料

可根据选择的仪器在反应体系中加入 ROX 参考染料，将反应体系中的荧光信号标准化。下表所列为使用不同仪器操作时所需的 ROX 量（每 50 $\mu$ l 反应体系）：

仪器	每50 $\mu$ l反应体系所需ROX量
ABI 7300、7900HT、StepOne等	5 $\mu$ l
ABI 7500、7500Fast、ViiA7、Stratagene Mx3000、Mx3005P及Mx4000等	1 $\mu$ l
Roche仪器、Bio-Rad仪器、Eppendorf仪器等	无需添加

## 操作方法

- 按下表所示设置您的实时 PCR 仪。最适温度和孵育时间可视具体情形而定。

两步法反应程序：

阶段	循环数	温度	时间	备注
预变性	1x	95 $^{\circ}$ C	3 min	酶活性激活
变性	35-40x	95 $^{\circ}$ C	5 sec	
退火/延伸		60 $^{\circ}$ C	15 sec	荧光信号采集
熔解曲线分析(Melting Curve stage)				

三步法反应程序：

阶段	循环数	温度	时间	备注
预变性	1x	95 $^{\circ}$ C	3 min	酶活性激活
变性	35-40x	95 $^{\circ}$ C	5 sec	
退火		50~60 $^{\circ}$ C	10 sec	
延伸		72 $^{\circ}$ C	15 sec	荧光信号采集
熔解曲线分析(Melting Curve stage)				

2. 建立如下所述的反应体系。若要进行多个反应，可制备通用组分的预混液，在每管或每孔中加入合适的体积，然后加入特殊的反应组分（例如，模板）。注：在定量 PCR 反应中，制备预混液以减少吸液误差是至关重要的。

组分	96孔板		384孔板		终浓度
	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	
2x QuantFast SYBR Green qPCR SuperMix	25 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l	1x
Primer F(10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.75 $\mu$ l	0.6 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M
Primer R(10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.75 $\mu$ l	0.6 $\mu$ l	0.3 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M
模板	x	x	x	x	
50x Rox Dye (可选)	1 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	
Nuclease-Free Water	至50 $\mu$ l	至25 $\mu$ l	至20 $\mu$ l	至10 $\mu$ l	

3. 盖上或密封反应管/PCR板，轻轻混匀。可以稍微离心，确保所有组分都在管/板底。  
4. 将反应体系置于荧光定量 PCR 仪中，收集数据并分析结果