

## Real-Time PCR PreMIX (染料法)

### 试剂组成

A2010A001	Amount	Storage
荧光定量 PCR PreMIX (染料法)	1 mL	-20°C
说明书	1 份	

### 产品介绍

本试剂提供了进行简便、灵敏的荧光 PCR 检测的完整系统, 包含了经过优化的缓冲液、dNTP、热启动 Taq DNA 聚合酶混合物、MgCl<sub>2</sub> 溶液和预混的 SYBR GREEN 染料, 成为一个即时可用的混合物。您不必再花费时间去混合试剂, 同时确保了结果的一致性和可重复性。

使用 BioTNT 荧光定量 PCR PreMIX 试剂可进行实时荧光 PCR 检测, 获得方便、灵敏和准确、可靠的检测结果。

### 产品使用限制

本产品只用于分子生物学研究。其不应用于诊断、预防和治疗疾病。在使用本产品时应遵从相应的注意事项。

### 注意事项

1. 本制品请于-20°C保存, 使用前请混匀放置冰上, 使用后请立即保存于-20°C, 推荐最多冻融6次;
2. 混匀制品后请避免高速或长时间离心, 以免荧光染料沉淀底部, 无法在 PCR 反应液配制时加入反应液。

### 客户自备设备和试剂

1. 模板: cDNA, 基因组 DNA, 质粒 DNA, 噬菌体 DNA;
2. 上下游引物, 推荐 BioTNT Preci® mRNA qPCR 引物对;
3. RNase-free Water;
4. 96 孔或 384 孔 PCR 板; 0.2mL 或 0.5mL Eppendorf 管 (无菌、无酶、RNase-free);
5. 移液器 (10μL、200μL 规格) 及 RNase-free Tips (10μL、200μL 的枪头);
6. Real-Time PCR 仪; 13000rpm 离心机;

### PCR 反应液配制

请按照下表准备 PCR 体系, 或者可以参考各实验室自己的实验组分添加:

反应液体系	20-μL 体系	50-μL 体系	Custom	终浓度
RNase-free Water	补足至 20μL	补足至 50μL	补足至 μL	——
荧光定量 PCR PreMIX (2X)	10μL	25μL	μL	1X
上游引物 (10μM)	0.4μL	0.4μL	μL	0.2μM
下游引物 (10μM)	0.4μL	0.4μL	μL	0.2μM
待检 DNA 样品	varies	varies	μL	*

\* 50-μL PCR 反应体系下推荐, 0.5–500ng 基因组 DNA, 1pg–50ng 质粒或环状 DNA, 1–20ng cDNA

## PCR 反应条件设置

请按照下表准备 PCR 体系, 或者可以参考各实验室自己的实验组分添加:

操作步骤		两步法反应条件*		三步法反应条件**	
		温度	时间	温度	时间
预变性***		95°C	5 minutes	95°C	5 minutes
40 个循环	变性	95°C	5 seconds	95°C	5 seconds
	退火	60°C	30 seconds	55°C	20 seconds
	延伸			72°C	20 seconds
hold		4°C	hold	4°C	hold

\* 当引物  $T_m$  值  $\geq 60^\circ\text{C}$ , 扩增产物  $< 300\text{bp}$  时, 推荐两步法反应条件;

\*\* 当引物  $T_m$  值  $< 60^\circ\text{C}$ , 扩增产物  $> 300\text{bp}$  时, 推荐三步法反应条件;

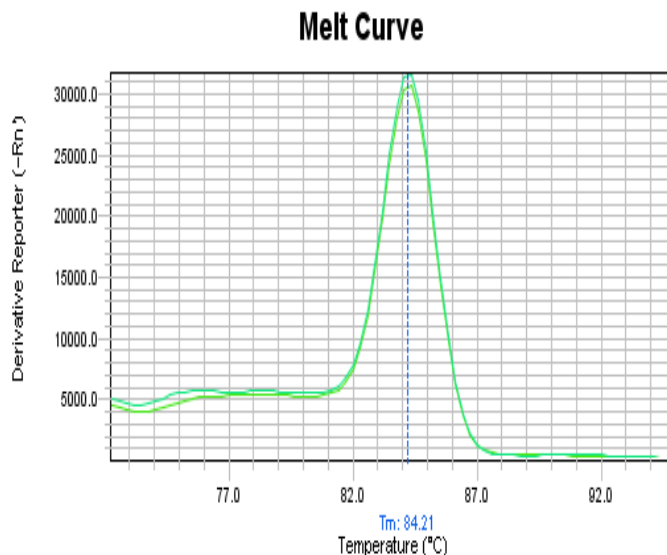
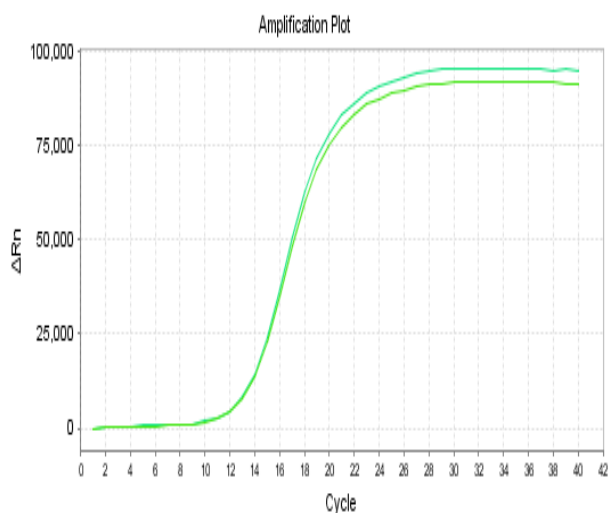
\*\*\* 本 mix 采用的是化学法修饰的 hot start 酶, 该酶保证了 Real-Time PCR 实验的特异性, 并降低了实验操作难度(反应液配制时不需要在冰上操作, 加样时间即使比较长, 非特异性反应很少), 必须有  $95^\circ\text{C}$  5 分钟这一步, 否则会导致后面的反应不能进行, 没有信号检测出;

## PCR 结果判断

1、扩增曲线为 s 型, 如下左图所示:

2、熔解曲线为单峰, 且峰的  $T_m$  值与产物理论  $T_m$  相差不大(在  $\pm 2^\circ\text{C}$  以内), 如下右图所示:

注: 引物设计软件报告会通过计算 CG 含量以及序列位置得到理论  $T_m$  值, 实验所得熔解曲线峰所对应的  $T_m$  值会因为仪器的不同而变化, 但变化不会超过  $\pm 2^\circ\text{C}$ , 如果相差过大, 可能并不是目的基因的产物。



## 技术支持

BioTNT 为其所提供的技术支持质量和效率而自豪。我们的技术支持部门在样品及检测领域及对 BioTNT 产品具有丰富的实践经验和充足的理论知识。如果您 PCR 或其它产品有问题或遇到困难, 请联系我们, 无需迟疑。

BioTNT 客户是我们产品改进和特殊应用信息的主要来源。您所提供的信息对于 BioTNT 的研究人员很有帮助。

当您对产品性能或新的应用及新的技术有任何建议时, 我们希望您能及时联系我们。

有关技术支持和更多信息, 请浏览 [www.biotnt.com](http://www.biotnt.com) 的网页或致电 BioTNT 的技术支持部门。