

## 特点:

Tiosbio® 2x Kappa SYBR Green I qPCR Mix (no ROX) 是基于 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real-Time PCR 的 2x 浓度预混液。该预混液包括热启动 DNA 聚合酶、反应 Buffer、dNTPs、SYBR Green I 等试剂，试验时仅需加入引物、模板、水。HotStart Taq DNA Polymerase 高温加热前，anti-Taq 单克隆抗体与 Taq 酶结合，抑制 Taq 酶的聚合酶活性，从而抑制在低温条件下出现的由引物和模板 DNA 非特异性杂交或引物二聚体引起的非特异性扩增。Anti-Taq 单克隆抗体在 PCR 反应第一循环的变性步骤中已完全失活，不会阻碍之后的 Taq Polymerase 反应，大大提高了 PCR 反应的灵敏度及特异性。优化浓度的 SYBR Green I 荧光染料，特异性地掺入 DNA 双链后，荧光信号增强，而不掺入链中 SYBR Green I 染料分子荧光信号不变，从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步，荧光可以在退火或延伸阶段测定。

该产品适用的 PCR 仪包括：LightCycler (Roche Diagnostics)；MiniOpticon、Opticon2、MyiQ 2、CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad & MJ)；Line-Gene(Bioer, 杭州博日)等。

## 包装量及储存条件:

TR0204-1 为 1mL，用量为 100 次 (20μL/次)；TR0204-5 为 5mL，用量为 500 次 (20μL/次)。

长期保存，请置于 -20°C，有效期 24 个月。长期 -20°C 保存融化后，产品可能会出现沉淀，只需室温融化后混合均匀即可。经常使用，可于 4°C 保存六个月。

## 使用方法:

1. 室温融解 2x Kappa SYBR Green I qPCR Mix (no ROX)，上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，经短暂离心按照下表配制 qPCR 的反应体系(配制溶液时尽可能减少光下的曝露时间,长时间曝光可导致荧光信号强度丧失):

名称	体积 (μL)	终浓度
2x Kappa SYBR Green I qPCR Mix (no ROX)	10	1x
PCR Forward Primer(10 μM)	0.4~0.8	0.2~0.4 μM
PCR Reverse Primer(10 μM)	0.4~0.8	0.2~0.4 μM
模板	0.5~2 μL*	
ddH <sub>2</sub> O	至总体积 20	

\*10~100 ng 基因组 DNA，或 1~10 ng cDNA。模板中目的基因的拷贝数可能存在较大差异，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。另外，两步法中如以 cDNA (第一链 cDNA 合成反应产物) 作为模板时，第一链 cDNA 合成反应产物的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2. 按照三步法设置 PCR 程序。扩增速度约为 1~2kb/min，物种、目的基因及扩增引物对 PCR 反应条件略有影响。每个反应的具体运行程序根据试验情况进行调整。

循环	温度	时间
1st Cycle	95°C	30~60sec
	95°C	15sec
35~40 Cycles	50~65°C	15sec
	72°C	30~60sec*
Melting curve analysis		
Hold	4°C	Forever

\*目标片段长度 ≤ 300bp 时，仅需延伸时间 30 秒。但某些定量仪器为测定稳定的荧光，延伸时间需要大于 30 秒。扩增曲线散乱，或者各孔间差异较大时，请设定较长的延伸时间 (45~60 秒)。

3. 反应结束后确认 Real-Time PCR 的扩增曲线、融解曲线和标准曲线。