

## ABKfast Universal qPCR mix (SYBR Green)

### 产品信息

产品组成	ABK0006M
2 x SYBR qPCR Mix	1.1 mL*5

### 产品存储

-20 °C 避光保存 24 个月，使用前充分融解混匀，避免反复冻融。

### 产品简介

ABKfast Universal qPCR mix 采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时荧光定量 PCR。本产品为 2×qpcr 预混液，该组分已经添加了通用 ROX，故无需根据不同的仪器上进行 ROX 浓度调整。该预混液的核心组分为 ABKFast Taq DNA Polymerase，其在高温加热前，抗 Taq 单克隆抗体与 Taq 结合，抑制 Taq 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。抗体在 PCR 反应的预变性步骤中失活，不会影响后续 Taq 酶聚合反应，大大提高了 PCR 反应的灵敏度及特异性。

本产品中含有通用 ROX，只需在配制反应体系时加入引物和模板即可进行扩增。具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点。

### 注意事项：

1. 使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
2. 尽可能减少 ABKfast Universal qPCR mix 在光下的曝露时间，长时间的曝露可导致荧光信号减弱。
3. 反应液的配制、分装请一定使用无污染的枪头、管子等，尽量避免交叉污染。

### 实验步骤

- 1、用户需自备的试剂：cDNA 或 DNA 模板、引物、水。
- 2、请按照不同品牌荧光定量 PCR 仪的操作要求进行实验操作。

### 3、以 20, 50 $\mu\text{L}$ 反应体系为例, 推荐的 PCR 反应条件 (反应液配制请在冰上进行)

成分	体积 (20 $\mu\text{L}$ )	体积 (50 $\mu\text{L}$ )
2 x SYBR qPCR Mix	10 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
DNA 模板	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Forward Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Reverse Primer (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O to final volume	补足至20 $\mu\text{L}$	补足至50 $\mu\text{L}$

注: 模板量: 10-100 ng 基因组 DNA 或 1-10 ng cDNA 为参照, 因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同, 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 RT-PCR 反应的 cDNA (RT 反应液) 作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。引物: 通常引物浓度以 0.2  $\mu\text{M}$  可以得到较好结果, 可以终浓度 0.1-1.0  $\mu\text{M}$  作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下, 可提高引物的浓度; 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度, 由此优化反应体系。为了获得理想的 qPCR 的效果, 扩增片段的长度建议为 80-200bp。

### 4、PCR 反应条件设置: 两步法 PCR 扩增程序

	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	2 min (30 s-5 min)	
变性	95 $^{\circ}\text{C}$	10 s (3 s-15 s)	40
退火/延伸	60 $^{\circ}\text{C}$	30 s (10 s-40 s)	
溶解曲线 (仪器自动设置)			

注: 预变性时间: 标准程序选择 2min, 适合大多数模板; 快速程序最短可选择 30s; 复杂或高 GC 模板, 可适当延长预变性时间至 5min。

变性时间: 标准程序 10s; 快速程序最短可选择 3s。

退火/延伸温度: 对于复杂模板、高 GC 含量的扩增子, 建议增加退火和延伸温度至 68 $^{\circ}\text{C}$ 。

退火/延伸时间: 标准程序 30s, 可以满足绝大多数的 qPCR 实验; 对 200bp 以内的扩增子, 延伸时间最短可设置为 10s; 对于超过 350bp 或者高 GC 含量的扩增子, 建议增加延伸时间至 40s 或者采用三步法以提高扩增效率。

### 三步法 PCR 扩增程序

	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	2 min	
变性	95 $^{\circ}\text{C}$	15 s	40
退火	60 $^{\circ}\text{C}$	15-30 s	
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
溶解曲线 (仪器自动设置)			

注: 以上举例为常规 qPCR 反应系统, 可供参考。实际反应条件需根据模板、引物等的结构不同进行优化。