

版本号: FP121221

RealMaster Mix (SYBR Green)

目录号: FP202

产品内容

产品组成	FP202-01	FP202-02
2.5× RealMaster Mix (with ROX)	50 μl × 50 rxn 1 ml	50 μl × 200 rxn 4 × 1ml
20× SYBR Solution	150 μl	600 μl

储存条件

该试剂盒在4℃可储存3个月。若要长时间储存, 请将2.5× RealMaster Mix (with ROX) 与20× SYBR Green置于-20℃避光保存。将20× SYBR solution加入至2.5× RealMaster Mix 后, 可在-20℃储存3个月以上。如果RealMaster Mix解冻后没有使用, 必须彻底混合均匀后才能重新冷冻; 因为在解冻过程中盐会出现分层现象, 未混匀进行冷冻, 盐晶体的析出将会对酶造成损害。

产品简介

本产品适用于SYBR Green法进行模板的荧光定量PCR检测，RealMaster Mix中提供了一种独特的Hot-start 酶（已获得专利），我们命名为HotMaster Taq DNA聚合酶（包含在2.5×RealMaster Mix中），该酶与一般Hot-start 酶不同之处在于，一般的Hot-start 酶只在第一步温度升高之前封闭酶的活性，而HotMaster Taq DNA聚合酶利用抑制剂通过温度调节方式封闭HotMaster Taq DNA聚合酶的底物结合位点，温度低于40°C时，形成非活性的酶-抑制剂复合物，当温度升高至引物特异性的退火温度时，结合平衡向模板-特异性引物复合物形成方向移动，因此最大限度的减少PCR扩增全程中的非特异性扩增产物产生，大大提高了荧光定量PCR反应的精确性。

本产品RealMaster Mix中特别添加了ROX内参染料，用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

反应的buffer系统包含dNTP，增强剂，稳定剂等以提高产物特异性和反应灵敏度。RealMaster Mix拥有特殊的Mg²⁺自动调节系统，在整个反应过程Mg²⁺始终保持最佳浓度，提高扩增效率。

需自备的试剂

- 1 分子生物学实验级别的水（无核酸酶）
 - 2 DNA模板
 - 3 PCR引物
-

操作步骤

— SYBR检测方法:

请注意将**2.5×RealMasterMix**和**20×SYBR solution**避光保存。

1. **20×SYBR solution**在室温下平衡并彻底混匀。
2. 将125 μl **20×SYBR solution**加入至1.0 ml **2.5×RealMasterMix**中。

加入20×SYBR solution的2.5×RealMasterMix溶液在-20℃可以保存三个月。在使用前务必彻底混匀RealMasterMix/SYBR solution。如果解冻后并没有使用，一定要注意在再次冷冻前彻底混匀。

RealMasterMix/SYBR solution不能用于杂交探针法。

反应体系

组成成分	50 μl 体系	25 μl 体系	20 μl 体系	终浓度
2.5×RealMasterMix /20×SYBR solution	22.5 μl	11.25 μl	9 μl	1×
正向引物	-	-	-	100-300 nM
反向引物	-	-	-	100-300 nM
DNA 模板	-	-	-	-ng-pg
超纯水	至50 μl	至25 μl	至20 μl	-

二 PCR检测

HotMaster Taq DNA聚合酶与其他热启动Taq酶不同之处是不需要热激活处理，缩短了整个PCR所需时间。对于大多数模板，起始的解链过程只需94-95℃ 1-2 min。如果模板的GC含量很高，则起始解链过程时间需延长至10-15 min，为得到最佳结果，对不同的模板可采用梯度PCR优化反应条件。

注意：HotMaster Taq DNA聚合酶的延伸温度范围是60-70℃，最佳延伸温度为68℃。

反应步骤（建议）

循环	步骤	温度	时间	内容
1×	1	94-95℃	1-2 min*	起始模板变性
35-45×	2	94-95℃	10-20 sec	PCR循环中模板变性
	3	50-60℃	10-30 sec	退火
	4	68℃	10-60 sec	延伸

* 解链时间的长短与模板的长度和GC含量有关
