



2 × 探针法预混实时荧光定量快速 PCR 反应体系

2 × Probe qPCR Fast Mix

货号：C06-01023

规格：1.1ml /1.1ml×5 /1.1ml×10

保存条件：-20℃避光保存，有效期 24 个月，避免反复冻融；若长期使用，可置于 4℃保存至少 3 个月。

产品简介：

本产品是专用于探针法（TaqMan, Molecular Beacon 等）实时荧光定量的预混体系，产品含有优化浓度的 Hot Start Taq DNA Polymerase、dNTPs、Mg²⁺、反应缓冲液和稳定剂等成分。主要用于基因组 DNA 靶序列和 RNA 反转录后 cDNA 靶序列的检测，如基因表达分析，拷贝数分析，SNP 基因型分析等，适用于不同类型探针法荧光定量 PCR。Hot Start Taq DNA Polymerase 高温加热前，抗 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 非特异性扩增或引物二聚体引起的非特异性扩增。抗 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。

本产品为 2×探针法预混实时荧光定量快速 PCR 反应体系，使用时只需加入模板、引物、探针、ROX Reference Dye(根据不同荧光定量 PCR 仪选择使用)和水，使其工作浓度为 1×，即可进行反应。具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点，可减少人为误差、节约 PCR 实验操作时间、降低污染机率。

产品组分：

组分名称	1.1ml	1.1ml × 5	1.1ml × 10
2 × Probe qPCR Fast Mix	1.1 ml	1.1ml × 5	1.1ml × 10
High ROX Reference Dye	40 μl	200 μl	400 μl
Low ROX Reference Dye	40 μl	200 μl	400 μl

注：不同仪器对应的 ROX 不同：

需加 High ROX Reference Dye (50×) 的机型：ABI Prism7000/7300/7700/7900HT 和 ABI Step One /ABI Step One Plus.

需加 Low ROX Reference Dye II (50×) 的机型：ABI Prism7500/7500 Fast, MJ Research Chromo4, Opticon (II), Corbett Rotor Gene 3000.

无需加 ROX Reference Dye 的机型: Thermal Cycler Dice Real Time System , LightCycler , Smart Cycler System , Corbett Rotor-gene 6000, Agilent Technologies Mx3000P 等荧光定量 PCR 仪.

操作示例：

用户需自备的试剂：cDNA 或 DNA 模板、引物、探针。

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。

1. 按下表配制PCR反应体系（以20μl和50μl PCR反应体系为例）：

组分名称	体积 (20μl 体系)	体积 (50μl 体系)
DNA 模板*	0.4μl	1μl
正向引物 (10 μM) **	0.5μl	1μl
反向引物 (10 μM) **	0.5μl	1μl
探针***	0.5μl	1μl
2 ×Probe qPCR Fast Mix	10 μl	25μl
High/Low ROX Reference Dye	0.4μl	1μl
DEPC-ddH ₂ O	补至 20 μl	补至 50 μl

*: 模板量: 10-100 ng基因组DNA, 或1-10 ng cDNA, 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。

**：引物：通常引物浓度以 0.2 μM 可以得到较好结果, 可以终浓度 0.1-1.0 μM 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 80-200 bp。

***: 使用的探针浓度, 与使用的荧光定量PCR仪、探针种类、荧光标记物质种类有关, 实际使用时请参照仪器说明书, 或各荧光探针的具体使用要求进行浓度的调节。

2. 进行PCR 反应:

建议采用两步法 PCR 反应程序, 如果该程序得不到良好的实验结果时, 再进行 PCR 条件的优化。由于使用 T_m 值较低的引物或扩增片段较长等原因, 两步法 PCR 反应扩增性能较差时, 可以尝试进行三步法 PCR 扩增反应。

两步法流程	温度	时间	
预变性	95°C	2min	
变性	95°C	15 sec	} 35-45 个循环
退火-延伸	60°C	30 sec	
三步法流程	温度	时间	
预变性	95°C	2min	
变性	95°C	15 sec	} 35-45 个循环
退火	55-65°C	15-30 sec	
延伸	72°C	30 sec	

实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异, 需根据模板、引物、目的片段的特点设定最佳反应条件, 并根据比例放大或缩小反应体系。

3. 在适当的仪器上完成实验, 并分析结果。