

## 2×AllinOne™ Q-PCR Mix ROX<sup>+</sup>(for ABI)

产品套装编号: **D0102A**

产品内容	产品编号	包装规格
2×AllinOne™ Q-PCR Mix ROX <sup>+</sup>	D01020A	1 ml×2 (20 µl反应×200次)
ddH <sub>2</sub> O (PCR Grade)	C10030A	1 ml×2

储存条件: -20℃保存

### ■ 产品概述:

本产品是采用PCR技术结合SYBR Green I嵌合荧光法进行荧光定量PCR (Real-Time PCR) 的专用试剂, 产品中包含有DNA聚合酶、反应Buffer、dNTP、SYBR Green I和ROX。使用时只需加入模板和引物即可在ABI仪器上进行Real-Time PCR 实验, 操作非常方便快捷。

本产品主要适用于市场上需要ROX校正的ABI 公司的 Real-Time PCR仪。

### ■ 产品原理:

#### 1. PCR技术

本产品中的DNA聚合酶是经特殊修饰的 DNA 聚合酶, 此热启动酶结合优化的反应Buffer 能有效地抑制非特异扩增产物的产生, 极大地提高了PCR的扩增效率及其检测灵敏度。

#### 2. SYBR Green I 嵌合荧光

SYBR Green I 是一种荧光染料, 能特异地掺入到双链DNA分子的小沟部位, 发出荧光信号。在PCR 反应体系中, SYBR Green I 染料与DNA双链分子结合发出荧光, 通过检测反应过程中SYBR Green I的荧光强度, 达到检测PCR产物扩增量的目的。同时在PCR结束后可以直接进行融解曲线分析, 从而判断是否存在变异或非特异性扩增产物。

### ■ 注意事项:

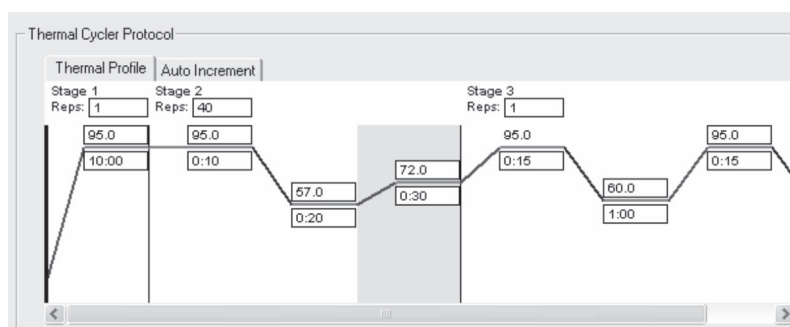
1. 此产品应在-20℃避光保存, 避免在4℃或室温存放。
2. 使用前请缓慢颠倒混匀试剂, 避免起泡, 并经短暂离心后再使用。
3. 配制PCR反应液时请使用PCR级水, 同时避免强光照射。
4. 为尽可能减少核酸扩增污染, 请严格遵守标准的PCR流程。

### ■ 操作说明:

1. 取出2×AllinOne™ Q-PCR Mix ROX<sup>+</sup>, 上下轻缓颠倒混匀, 在配制前进行短暂离心。
2. PCR反应液配制说明(例)(冰上操作)

试剂组分	体积	终浓度
2×AllinOne™ Q-PCR Mix ROX <sup>+</sup>	10 µl	1×
PCR Forward Primer (4 µM)	2 µl	0.4 µM
PCR Reverse Primer (4 µM)	2 µl	0.4 µM
ddH <sub>2</sub> O (PCR Grade)	1 µl	
Template	5 µl	
Total Volume	20 µl	

- ※ 将2×AllinOne™ Q-PCR Mix ROX<sup>+</sup>设定为总反应体积的一半，其它组分请按最适当比例调整。如果要变更总反应体积，请保持最适条件下各组分的比例。
  - ※ 引物是Real-Time PCR的重要因素，在引物设计时，建议使用Oligo、Primer Premier等引物设计软件。在PCR反应时，引物浓度通常在0.2 μM至0.6 μM范围内调整，一般浓度为0.4 μM时能得到较好的结果。扩增效率不高时，可适当增加引物用量，但引物太多，可能会导致非特异性扩增产物增加。
  - ※ DNA模板的添加量通常在100 ng以下，因不同种类的DNA模板中含有的靶基因拷贝数不同，必要时可以进行梯度稀释，确定最佳的DNA模板添加量。如使用反转录cDNA作为模板，请稀释后再使用。原液也可以用，但cDNA反转录体系对定量可能会产生影响。
3. 充分混匀PCR反应液，添加至PCR反应管或反应板中，并进行短暂离心，确保所有试剂流到反应管底部。
  4. PCR反应，建议使用如下图所示的PCR反应程序及其融解曲线分析程序。



- ※ 产品采用的DNA聚合酶为经过特殊修饰的热启动酶，需要95°C 10 min充分激活酶活性。
- ※ PCR反应程序建议使用标准的三步法，同时荧光检测建议设定在PCR延伸过程中。
- ※ 退火温度应该结合引物的T<sub>m</sub>在55°C~60°C进行调整。引物结合的最佳值可能超出此范围，可以根据实际情况进行调整。
- ※ Real-Time PCR扩增的片段最佳长度为80~150 bp，可以适当延长至300 bp。
- ※ 融解曲线分析的起始温度值可以在60~80°C范围内适当调整。

## ■ 数据分析:

根据实验设计进行必要的数据分析，具体操作参考所使用仪器的说明书。

## ■ 实验示例:

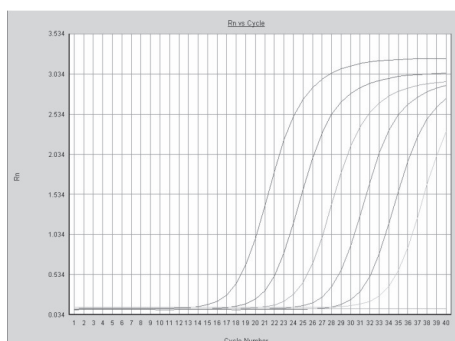
1. 实验目的: 通过梯度稀释质粒DNA，制作标准曲线，来判定2×AllinOne™ Q-PCR Mix ROX<sup>+</sup>的扩增效率及其检测灵敏度，其中检测片段长度为102 bp。
2. 使用仪器: ABI PRISM 7300
3. 操作流程:
  - 1) 将质粒按10的倍数稀释成10<sup>5</sup>分子/μl ~ 1分子/μl共6个浓度梯度。
  - 2) 配制PCR反应液（冰上操作）

试剂组分	体积
2×AllinOne™ Q-PCR Mix ROX <sup>+</sup>	10 μl
PCR Forward Primer (4 μM)	2 μl
PCR Reverse Primer (4 μM)	2 μl
ddH <sub>2</sub> O (PCR Grade)	1 μl
反应液mix	15 μl

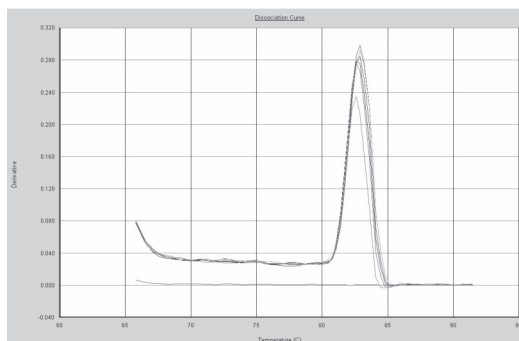
- 3) 充分混匀PCR反应液mix，短暂离心后添加至PCR反应管中。
- 4) 添加稀释后的质粒模板5 $\mu$ l至各个反应管中，阴性对照使用5 $\mu$ l的灭菌水代替DNA质粒模板。
- 5) 设置PCR反应条件及其融解曲线读取条件：

循环数	步骤	温度	时间	检测
1	预变性	95 $^{\circ}$ C	10 min	off
40	变性	95 $^{\circ}$ C	10 sec	off
	退火	57 $^{\circ}$ C	20 sec	off
	延伸	72 $^{\circ}$ C	30 sec	on
	融解曲线读取	60 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C		on
	冷却	40 $^{\circ}$ C	1 min	off

- 6) 实验结束后，分析扩增曲线及其融解曲线：

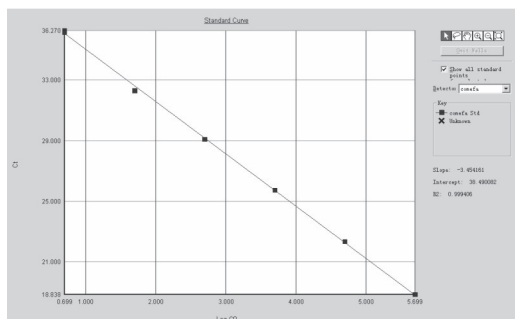


梯度稀释的质粒DNA扩增曲线



扩增产物融解曲线峰

- 7) 由各扩增曲线所得到的Ct值，进行标准曲线的制作。



标准曲线图

- 8) 实验结论

从扩增曲线及其融解曲线分析可知，以质粒DNA为模板，可以检测到低至5个分子的拷贝数，产物单一，说明2 $\times$ AllinOne<sup>TM</sup> Q-PCR Mix ROX<sup>+</sup>具有极高的检测灵敏度；同时从标准曲线可以看出其检测的各个浓度间线性关系良好，说明其具有优良的扩增效率。

## ■ 问题分析:

### 1. 扩增曲线混乱

- ※ 荧光检测温度设置不当, 请调整到合适的荧光检测温度。
- ※ 样品位置设定错误, 请设定正确的样品位置再进行分析。
- ※ PCR循环条件、引物浓度、序列等不恰当, 请调整引物浓度、退火温度。扩增不好时, 应尝试降低退火温度或提高引物浓度, 仍不能改善建议重新设计引物。
- ※ 样品纯度不好, 应对样品进行苯酚抽提或乙醇沉淀等方法进行纯化处理, 如果样品为cDNA, 最好稀释后再用, 因为反转录体系对PCR有一定的影响。
- ※ 是否在程序中选择了ROX做参比荧光, 而添加的试剂为不含ROX的Q-PCR Mix。

### 2. 定量值重现性差

- ※ 仪器故障, 因为仪器的不适用, 在温度的管理或检测方面重现性差, 应根据相应仪器的说明书进行检测。
- ※ 样品纯度不好, 不纯的样品会导致实验的重复性差, 应使用纯化过的DNA样品, 并在使用前充分混匀样品, 对于cDNA样品, 最好稀释后再用。
- ※ PCR循环条件、引物浓度、序列等不恰当, 扩增效率差的PCR容易产生重现性差的结果, 请调整引物浓度、退火温度来提高扩增效率, 扩增不好时, 应尝试降低退火温度或提高引物浓度, 仍不能改善建议重新设计引物。

### 3. 融解曲线异常

- ※ 空白样品中有信号
  - A) 如果空白对照所对应融解曲线的 $T_m$ 与阳性对照一致, 说明PCR反应体系可能有污染或其为阳性样品, 为此应首先排除其是否为加样误差, 如仍有相同情况, 应更换PCR级水、引物或启用新的Q-PCR Mix。
  - B) 如果空白对照所对应融解曲线的 $T_m$ 值比阳性对照低, 说明可能产生了引物二聚体等的非特异性扩增, 为此建议PCR反应体系应在冰上配置, 并提高荧光检测温度, 如不能改善, 请重新设计引物。
- ※ 阳性对照的融解曲线出现双峰或多峰。
  - 阳性对照的融解曲线出现双峰或多峰, 说明其有非特异性扩增产生。建议PCR反应体系应在冰上配置, 并提高退火温度, 如不能改善, 请重新设计引物。

该产品仅限于实验科学研究用, 若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途, 本公司概不承担任何责任。



地址: 广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器D区8楼, 510663  
客服电话: 020-32068595 电子信箱: support@fulengen.com 网址: www.fulengen.com