

2×Probe AllinOne™ Q-PCR Mix

产品套装编号: **D0103A**

产品内容	产品编号	包装规格
2×Probe AllinOne™ Q-PCR Mix	D01030A	1 ml×2 (20 µl反应×200次)
ddH ₂ 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技术结合水解型探针进行荧光定量PCR (Real-Time PCR) 的专用试剂, 产品中已包含有DNA聚合酶、反应Buffer、dNTP等试剂, 使用时只需要加入模板、引物及其相对应的水解型探针 (如TaqMan探针), 即可进行Real-Time PCR 实验, 操作非常方便快捷。

本产品主要适用于市场上不需要进行ROX校正的定量PCR仪, 如Roche、Bio-Rad、Stratagene 等公司生产的定量PCR仪。

■ 产品原理:

1. PCR技术

本产品采用的DNA聚合酶经过特殊修饰, 使其不仅具有热启动的能力, 还具有高效的5'~3'核酸水解酶活性。在使用中, 其结合优化的反应Buffer, 不仅能高效率地扩增, 并同时能有效地对探针进行水解, 从而极大地提高了PCR的扩增效率和检测灵敏度。

2. 水解型探针

水解型探针是一段能特异地结合到目的DNA片段上, 并且两端分别标记有荧光报告基团和淬灭基团的寡核苷酸。在探针完整时, 此两个荧光基团符合能量共振转移规律而不能检测到报告基团的荧光; 而在PCR扩增中, 结合在DNA片段特异位点上的探针被DNA聚合酶水解, 从而释放出荧光。本产品即是通过检测反应进程中荧光报告基团的荧光积累强度, 而达到检测PCR产物扩增量的目的。

■ 注意事项:

1. 本产品应在-20℃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×Probe AllinOne™ Q-PCR Mix, 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×Probe AllinOne™ Q-PCR Mix	10 µl	1×
PCR Forward Primer (8 µM)	1 µl	0.4 µM
PCR Reverse Primer (8 µM)	1 µl	0.4 µM
Hydrolysis Probe (2 µM)	1 µl	0.1 µM
ddH ₂ O (PCR Grade)	2 µl	
Template	5 µl	
Total Volume	20 µl	

- ※ 将2×Probe AllinOne™ Q-PCR Mix 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的增加。
 - ※ 在反应体系中水解型探针的浓度通常在0.05 μM 至 0.2 μM范围内调整，一般在浓度为0.1 μM时就能取得较好的实验结果，如果浓度偏低，会直接导致Ct值和荧光值的降低。
 - ※ 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，建议使用两步法程序进行PCR反应。

循环数	步骤	温度	时间	检测
1	预变性	95℃	10 min	off
45	变性	95℃	10 sec	off
	退火并延伸	60℃	30 sec	on
1	冷却	30℃	1 min	off

- ※ 产品采用的DNA聚合酶为经过特殊修饰的热启动酶，需要95℃ 10 min充分激活酶活性。
- ※ PCR反应程序建议使用两步法，同时荧光检测建议设定在退火并延伸步骤末。
- ※ 在一般条件下，水解型探针检测法的退火并延伸步骤的温度都设定在60℃，所以在引物和探针设计时其Tm值不应低于60℃，并且根据要求探针的Tm应略高于引物的Tm值，这样才能保证在延伸时探针与目的片段稳定结合。
- ※ Real-Time PCR 扩增的片段长度建议小于100 bp，并且扩增片段的GC含量在40%~55%之间，这样有利于提高探针法的检测灵敏度。

■ 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:

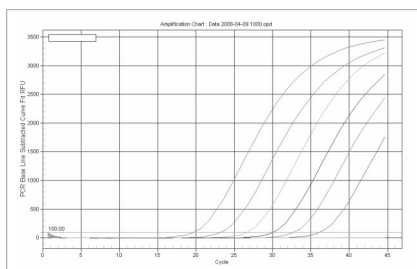
1. 实验目的：通过梯度稀释质粒DNA，制备标准曲线，来判定2×Probe AllinOne™ Q-PCR Mix的扩增效率及其检测灵敏度，其中检测片段长度为69 bp。
2. 使用仪器：iQ5 (Bio-Rad)
3. 操作流程：
 - 1) 将质粒按10的倍数稀释成10⁵分子/μl ~ 1分子/μl共6个浓度梯度。
 - 2) 配制PCR反应液（冰上操作）

试剂组分	体积
2×Probe AllinOne™ Q-PCR Mix	10 μl
PCR Primer mix (4 μM each)	2 μl
Hydrolysis Probe (2 μM)	1 μl
ddH ₂ O (PCR Grade)	2 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 μ l至各对应的反应管中，阴性对照使用5 μ l的灭菌水代替DNA质粒模板。
- 5) 设置PCR反应条件：

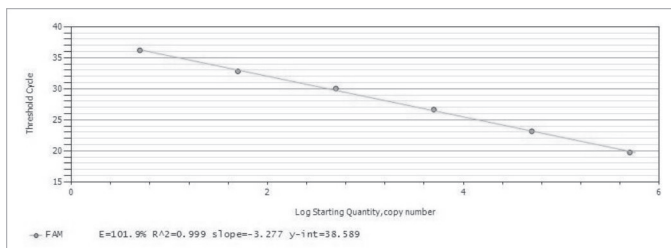
循环数	步骤	温度	时间	检测
1	预变性	95℃	10 min	off
45	变性	95℃	10 sec	off
	退火并延伸	60℃	30 sec	on
1	冷却	30℃	1 min	off

- 6) 实验结束后，查看扩增曲线：



梯度稀释的质粒DNA扩增曲线

- 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

从扩增曲线上可知，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 Probe AllinOneTM Q-PCR Mix 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

- ※ 荧光检测温度设定不恰当，请调整至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、退火温度来改善。扩增不佳时，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。

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。
- ※ 低表达量的基因检测或样品进行了大量的稀释也易发生重现性差的结果。

3. 扩增曲线异常或效率不高

- ※ 选择检测的荧光波长错误或仪器需重新校正。
- ※ 阴性对照有信号，理论上讲使用探针法来检测其阴性对照都不会有扩增曲线信号出现，如果阴性对照有扩增曲线，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，可能为试剂或环境污染，应更换PCR级水、引物或启用新的Q-PCR Mix，并且在通风条件良好的环境中开展实验。
- ※ 样品扩增效率不高，应首先确认是否为本身基因的表达量偏低，其次再确认扩增片段的GC含量是否偏高，最后再优化反应条件，如调整引物或探针浓度。

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