

BrightFISH® Universal qPCR PreMix

(通用qPCR预混液)

使用说明书 (Ver.0.0.1)

产品特点

- ✧ 快速的探针法定量 PCR 预混试剂

产品货号:

JSR-E-606-125 (125 次反应) JSR-E-606-500 (500 次反应)



扫描二维码了解更多产品信息

目录 Contents

产品组份	1
储存条件	1
产品简介	1
产品特性	1
适用范围	1
操作步骤	2
注意事项	3

产品组份

试剂盒组成	125 次	500 次
2× Probe qPCR PreMix	4×1.25 ml	4×4×1.25 ml
50×ROX Reference Dye（选配）	1 ml	4×1 ml
RNase-Free Water	5×1 ml	4×5×1 ml

*本试剂盒中不提供 50×ROX Reference Dye，如有需要请单独购买

储存条件

本产品于 -30~-15℃可保存 12 个月。收到本产品后，请立即置于-30~-15℃下避光保存。从-30~-15℃取出使用时，将冻存的 2×Probe qPCR PreMix 和 50×ROX Reference Dye 融解，然后轻轻颠倒混匀，待溶液完全均一后再行使用。如解冻后没有使用，须彻底混匀后重新冷冻。（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伤害）。如需一段时间内经常取用，可在 2-8℃下保存，保质期 3 个月，避免反复多次冻融。

产品简介

Probe qPCR PreMix 利用序列特异性探针，可对 DNA 进行快速、灵敏的 Real-Time PCR 定量检测。优化的预混液使 PCR 的运行时间缩短 60%以上。

Probe qPCR PreMix 即用型预混液含有热启动酶和独特的 PCR 缓冲液，确保在任何 Real-Time PCR 仪上均可进行灵敏的定量 PCR 检测。

产品特性

- ✧ 反应速度快：Probe qPCR PreMix 采用了特异的抗体修饰热启动 DNA 聚合酶，配合精心优化的 Buffer 体系，使 PCR 反应时间比一般 qPCR 缩短 60%，并且具有定量准确，扩增效率高，重复性好和宽广的可信范围的特点；
- ✧ 扩增能力强：本产品经过优化使荧光信号的释放达到优良的效果，同时充分降解了探针荧光淬灭基团的信号释放，用相同量的模板将得到更强的信号；
- ✧ Probe qPCR PreMix 为 2×浓度的预混 Mix 形式，PCR 反应液配制时，只需加入模板、引物、探针、灭菌蒸馏水便可进行 Real-Time PCR 反应，操作简单方便。
- ✧ 本产品附带 ROX Reference Dye，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，方便客户针对不同型号荧光定量 PCR 仪时选择对应浓度使用。

适用范围

探针荧光定量 PCR 实验。

操作步骤

(一) 建立 Real-Time PCR 反应体系：

请注意将 Probe qPCR PreMix 和 50×ROX Reference Dye 避光保存。

- 1. 融解 2×Probe qPCR PreMix，50×ROX Reference Dye，模板，引物和 RNase-Free Water，彻底混匀，短暂离心后置于冰浴上。
- 2. 建议置于冰上进行 Real-Time PCR 反应液的配制。

反应体系：

试剂盒组成	体积/反应
2×Probe qPCR PreMix	25 μl
正向引物 (10μM)	1.25 μl
反向引物 (10μM)	1.25 μl
探针 (10μM)	1 μl
cDNA 模板	10pg-1μg
50×ROX Reference Dye	根据不同仪器添加
RNase-Free Water	补水至 50 μl
总体系	50 μl

*引物终浓度为 300nM 可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效果不高时，可增加 PCR 反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少 PCR 反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的，可以在 200-500nM 范围内调整。

*几种常见仪器的匹配 ROX Reference Dye 浓度见下表：

仪器	终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/StepOne 等	5×（例如：5 μl ROX / 50 μl 体系）
ABI 7500/7500 Fast； Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000	1×（例如：1 μl ROX / 50 μl 体系）
Roche 仪器，Bio-Rad 仪器，Eppendorf 仪器等	不用添加

(二) 进行 Real Time PCR 反应

建议采用两步法 PCR 反应程序进行反应；若模板量较低等因素导致扩增效果不佳，可使用三步法程序进行 PCR 反应。

两步法反应程序：

反应温度	反应时间	反应循环数	说明
95°C	1 min	1	预变性
95°C	5 sec	40	PCR 循环步骤，
60°C	15 sec		请在该步骤收集荧光

熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)

*使用不同型号仪器进行时间设定时，请按照仪器使用说明书要求进行实验操作，几种常见仪器的时间设定见下表：

仪器	时间
ABI 7700/7900HT/7500Fast, Roche, Bio-Rad 和 Agilent 等公司荧光定量 PCR 仪	15 sec
ABI 7000/7300	31 sec
ABI 7500	32 sec

通常引物退火温度比引物的解链温度 (T_m) 低 5°C，如果引物碱基数较少，可以适当提高退火温度，可以增加 PCR 的特异性；如果碱基数较多，可以适当降低退火温度。

3. 盖上反应管，轻柔混匀。可短暂离心，确保所有组分均在管底。
4. 将反应体系置于荧光定量 PCR 仪中，开始反应。

注意事项

1. 本产品中含有荧光染料 SYBR Green I，保存本产品或配制 PCR 反应液时应避免强光照射。
2. 如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。使用时请上下颠倒轻轻混匀，请不要使用振荡器进行混匀，尽量避免出现泡沫，并经瞬时离心后使用。
3. 引物纯度对反应特异性影响很大，建议使用 PAGE 级别以上纯化的引物。
4. 引物终浓度为 0.3 μ M 可以在绝大多数体系中获得良好的扩增结果。如果需要进一步优化，可以在 0.2-0.5 μ M 范围内调整引物浓度。
5. 20 μ l 反应体系中，cDNA 模板的使用量一般小于 100ng，基因组 DNA 模板量一般小于 50ng，逆转录产物作为模板时，逆转录体系的使用量应不超过 PCR 体系终体积的 20%。