

## Direct Multiplex Probe qPCR Mix Plus U

货号: P2801, P2802, P2803, P2804

### 产品简介

Direct Multiplex Probe qPCR Mix Plus U 是用于粗样本探针法 qPCR 的 2× 浓缩预混液, 使用时只需加入粗样本如血液、拭子、组织匀浆等, 引物和探针即可进行反应。本品含有抗体技术修饰的热启动酶 Hotstart Taq DNA 聚合酶, 配合东盛特制的 qPCR Buffer, 不仅高效裂解细胞释放 DNA, 而且有很强的耐受性, 并可以进行多重探针 qPCR 反应。该试剂引入了 dUTP/UDG 防污染系统, 可以在 PCR 反应前清除含 dUTP 的 PCR 产物, 有效避免因扩增产物的交叉污染对定量影响。本品方便用于制备 IVD 分子诊断试剂盒, 对靶基因定量准确、可信度高, 重复性好。本品可搭配 TaqMan 等各类荧光探针使用, 与常见定量 PCR 仪完美兼容, 如 ABI、Roche、Bio-Rad 等。

### 产品组成

Component	P2801	P2802	P2803	P2804
2× Direct Multiplex Probe qPCR Mix Plus U <sup>a</sup>	1 ml	1 ml×5	50 ml	100 ml
超纯水	1 ml	1 ml×5	-	-

a 包含 Hotstart Taq DNA 聚合酶, dNTP/dUTP Mix, UDG (Uracil-DNA Glycosylase, 尿嘧啶 DNA 糖基化酶) 及反应缓冲液等。

### 保存条件

-20℃ 保存 2 年, 4℃ 可短期保存。

### 质量控制

纯度检测: 经质量检测, 产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测: 经不同来源的模板和引物检测, 产品具有优秀的特异性、灵敏性及可重复性等。

### 应用举例

#### 1. 配制反应体系

请于冰上配制以下反应体系:

Component	Volume	Final concentration
2× Direct Multiplex Probe qPCR Mix	15 µl	1×
Forward primer (10 µM) <sup>[1]</sup>	0.6 µl	0.2 µM
Reverse primer (10 µM) <sup>[1]</sup>	0.6 µl	0.2 µM
Probe (10 µM) <sup>[2]</sup>	0.3 µl	0.1 µM
Sample <sup>[3]</sup>	5 µl	-
超纯水	Variable	-
Total volume <sup>[4]</sup>	30 µl	-

[1] 引物终浓度建议范围: 0.1-1.0 µM, 通常引物终浓度为 0.2 µM 效果较好。

[2] 使用探针的浓度与 Real Time PCR 扩增仪、探针种类和荧光标记物种类有关, 使用时请参照相关说明。通常探针终浓度在 0.1-0.5 µM 之间。

[3] 不同类型的样本用量不同, 请根据需要进行调整。

[4] 建议总体积不小于 10 µl, 以免造成较大的加样误差。具体体积范围参考仪器说明。

注意: 对于某些固定型号的仪器, 需要添加 ROX 参比染料才能精确测定 Ct 值。由于 ROX 的使用体积较小, 建议将 ROX 提前与 qPCR Mix 混匀使用。ROX 用量参照具体仪器说明, 下表仅供参考。

Instruments	Final Conc. of ROX
ABI PRISM 7000/ PRISM 7700/ 7300/ 7900HT/ Step One/ Step One Plus/ GeneAmp 5700	500nM (High ROX)
ABI 7500/ 7500 Fast/ ViiA 7/ QuantStudio 6/7/12K Flex; Agilent Stratagene Mx3000P/ Mx3005P/ Mx4000	50nM (Low ROX)
Bio-Rad CFX96/ CFX384/ iQ/ iQ5; MJ Research Opticon 2/ Chromo 4; Roche LightCycler 480/ 96; Corbett Rotor Gene G/ Q/ 3000/ 6000; Thermo PikoReal 96; Eppendorf MasterCycler ep realplex; Cepheid Smart Cyclor	No ROX

## 2. 设定反应程序进行 qPCR 反应

两步法程序示例如下:

Stage	Temperature	Time	Cycle
UDG pre-treatment	37℃	2 min	1
Initial denaturation	95℃	2 min	1
Denaturation	95℃	10 sec	40
Annealing & Extension <sup>[1]</sup>	60℃	30 sec	

[1] 仪器在此阶段进行信号采集。请根据仪器类型设置反应时间。如需优化温度, 建议在 55-65℃ 范围内调整。

若反应效果不佳，建议采用三步法扩增程序。

经典三步法程序示例如下：

Stage	Temperature	Time	Cycle
UDG pre-treatment	37°C	2 min	1
Initial denaturation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	40
Annealing <sup>[1]</sup>	60°C	15 sec	
Extension	72°C	20 sec	

[1] 仪器在此阶段进行信号采集。常用退火温度在 55-65°C 之间。退火温度一般设定为所用引物的  $T_m - 5^\circ\text{C}$ ，若低于 55°C，则以  $T_m$  值为退火温度，一般不低于 55°C。请根据仪器类型设置反应时间。

### 3. 分析结果

观察扩增曲线；调整基线，计算 Ct 值；进行相对或绝对定量。

#### 注意事项

- 1 使用前 Mix 需要完全解冻，充分混匀。尽量避免多次反复冻融。短期使用可保存于 4°C。
- 2 将 (n+x) 份反应液混匀后再分注到 n 个单管中，可降低加样误差。(n 为重复次数，x 为损耗量，一般为 n 的 1/10)
- 3 ABI 的定量仪器大部分需要 ROX 校正管间差异，Bio-Rad 的定量仪器不需要 ROX 校正。具体仪器请参照其使用说明。
- 4 轻轻混匀反应液，避免产生气泡，气泡会干扰荧光检测。可瞬时离心去除气泡。
- 5 引物的特异性、用量以及退火温度是影响实验结果的重要因素。务必设计特异性好的引物，随实验结果适当调整引物用量 (0.1  $\mu\text{M}$ -1.0  $\mu\text{M}$ ) ——特异性较差时减少引物用量，或以 3°C 为增量提高退火温度，扩增效率较低时增加引物用量。
- 6 DNA 模板的量应小于 500 ng/反应，过高的模板量会引起非特异性扩增。应根据模板类型与基因表达量适当调整用量。
- 7 各类探针应参照相应的指南进行设计，并根据所用扩增仪类型、探针种类和荧光标记物种类等调整用量。

本品仅供科学研究使用。