

## Multiplex Probe qPCR Mix Plus U (Low ROX+)

### 货号规格

货号	P2701a	P2702a	P2703a	P2704a
25- $\mu$ l 反应数	80 rxns	400 rxns	4000 rxns	8000 rxns

### 产品简介

Multiplex Probe qPCR Mix Plus U (Low ROX+) 是用于探针法实时定量 PCR 的 2 $\times$  浓缩预混液, 使用时只需加入模板、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 Real Time PCR Buffer, 不仅有效抑制引物二聚体和其他非特异性扩增, 而且能够提高扩增效率。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。本品方便用于搭配 TaqMan、引物实现全预混 Master Mix 分子诊断试剂盒, 与常见定量 PCR 仪完美兼容, 如 ABI、Roche、Bio-Rad 等。本品已预混了低浓度 ROX 参比染料, 适用于 ABI、Roche 等需要低浓度 ROX 校正的荧光定量 PCR 仪, 可搭配 TaqMan 等各类荧光探针使用。本产品可以免冰盒配制反应体系, 可以直接于常温进行 PCR Mix、引物、模板等组分的配制, 配制好的 PCR 反应体系可以常温放置 24 小时而保持扩增效率不变。

### 产品组成

Component	P2701a	P2702a	P2703a	P2704a
2 $\times$ Multiplex Probe qPCR Mix Plus U (Low ROX+) <sup>a</sup>	1 ml	1 ml $\times$ 5	50 ml	100 ml
超纯水	1 ml	1 ml $\times$ 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 $^{\circ}$ C 保存 2 年, 4 $^{\circ}$ C 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	25- $\mu$ l rxn	Final Conc.
2 $\times$ Multiplex Probe qPCR Mix Plus U (Low ROX+)	12.5 $\mu$ l	1 $\times$
Forward primer (10 $\mu$ M) <sup>[1]</sup>	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
Reverse primer (10 $\mu$ M) <sup>[1]</sup>	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
Probe (10 $\mu$ M) <sup>[2]</sup>	1 $\mu$ l	0.1~0.5 $\mu$ M
DNA template <sup>[3]</sup>	2 $\mu$ l	-
超纯水	8.5 $\mu$ l	-
Total volume <sup>[4]</sup>	25 $\mu$ l	-

[1] 引物终浓度建议范围: 0.1-1.0  $\mu$ M, 通常引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 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  $\mu$ M 之间。

[3] DNA 模板建议用量 (25  $\mu$ l 体系): 1-10 ng cDNA, 或 10-100 ng gDNA。加样体积不宜过小, 以免造成较大的误差, 但未稀释的 cDNA 不宜超过总体积的 1/10。

[4] 建议总体积不小于 10  $\mu$ l, 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.
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 Cycler	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°C	2 min	1
Initial denaturation	95°C	30 sec	1
Denaturation	95°C	10 sec	40
Annealing & Extension <sup>[1]</sup>	60°C	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。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	30 sec	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。