

## High-throughput qPCR Mix (Taqman probe)

产品名称	High-throughput qPCR Mix (Taqman probe)
DBI-2235	40 Reaction
DBI-2236	200 Reaction

### ●储存条件

-20°C长期保存；如果频繁使用，建议储存于4°C。

### ●产品简介

- 本产品是采用探针法(TaqMan<sup>®</sup>, Molecular Beacon等)进行Real Time PCR的专用试剂。是一种2×浓度的荧光定量MIX试剂，进行实验时，Real Time PCR反应液的配制十分方便简单。
- 产品中的DNA聚合酶使用了公司精心研制的化学修饰法热启动Taq酶，与经过反复优化的Real Time PCR用Buffer组合使用，可以有效抑制非特异性的PCR扩增，显著提高PCR的扩增效率，进行高灵敏度、高特异性的Real Time PCR扩增反应。
- 本产品可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对目的基因进行准确定量检测，定量数据重复性好，精确度高。
- 采用嵌合荧光法(SYBR<sup>®</sup> Green 染料法)进行Real Time PCR实验时，建议使用Bestar qPCR Master Mix(SYBR GREEN 染料法)(Code:DBI -2043)。

### ●产品主要成份 (50ul反应\*200次量)

名称	数量
High-throughput qPCR Mix (Taqman probe)	1ml×5支
50×ROX Reference Dye	200ul×1支

备注：50×ROX Reference Dye 用于校正加样孔之间的体积误差和荧光信号误差，使用于以下荧光定量仪器，使用方法如下：

仪器名称	使用浓度
ABI PRISM 7000/7700/7900HT 和 7300 /Step One™/ Step One Plus™ Real-Time PCR System 荧光定量 PCR 仪器	使用ROX Reference Dye 终浓度为1×
ABI 7500、7500 Fast Real-Time PCR System 和 Agilent Technologies 公司的 Mx3000P 荧光定量 PCR 仪器	使用ROX Reference Dye 终浓度为0.1×

说明：1: qPCR实验时，在配置反应孔mix之前，每1ml Mix中加入40ul 50×ROX(qPCR实验仪器型号决定加入体积)或者50×ROX 4ul,用1ml移液器轻轻混匀。

2: 不用Reference Dye 校正的qPCR扩增仪器，使用时无需添加ROX。

### ● 试剂盒特点

- 1) 适用于各种Real Time PCR反应，可以快速、准确地对目的基因进行定性、定量检测。
- 2) 是一种2×浓度的荧光定量MIX试剂，PCR反应液配制时，只需加入模板、上下游引物、荧光探针、灭菌蒸馏水便可进行Real Time PCR反应，操作简单方便。
- 3) DNA聚合酶使用经过化学修饰型Bestar<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase，可以进行Hot Start法PCR反应(极大的防止副反应的发生)，再与公司精心优化的Buffer溶液结合使用，具有高扩增效率、高扩增灵敏度、高扩增特异性的特点。
- 4) 95°C 2min完全热启动，完全避免了非特异性反应的发生；

### ● 操作注意

- ❖ 以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前请认真阅读：
- ❖ 冻结产品融解后，请上下颠倒轻轻均匀混合，避免起泡，并轻微离心后使用。
- ❖ 溶解后的试剂请于冰上放置。
- ❖ 本产品中不含有实验使用的引物、荧光探针等。
- ❖ 反应液的配制、分装请一定使用新的(无污染)的枪头、Microtube等，尽量避免污染。

### ● Real Time PCR操作顺序

1. 溶解试剂，上下颠倒混匀，确认反应溶液完全溶解。（避免使用振荡器混匀，剧烈振荡会降低制品性能）。
2. 配制PCR反应混合液，分装至PCR反应管中。
3. 添加PCR扩增用模板。
4. 使用Real Time PCR扩增仪，进行PCR扩增反应。

注) 反应液配制方法和PCR扩增条件请参照使用方法。

Real Time PCR仪的使用方法，请参照各种仪器说明书。

请按照推荐的实验方法进行Hot Start法PCR扩增。

◆ **重要提示:**

本产品使用经过化学修饰型Bestar® Taq DNA Polymerase, 与其他公司的抗体型Hot Start用DNA聚合酶相比, 90℃以下避免了副反应的产生, 需要PCR反应前的95℃2分钟酶的活性化反应。如果高温处理时间太短, 会使酶的活性下降, 其PCR的扩增效率、定量精度等都会受到影响。如果在PCR反应前进行模板的预变性, 推荐设定为95℃ 2分钟。

● **操作方法**

◆ **用ABI PRISM 7000/7700/7900HT, 7300/ Real-Time PCR System 的操作方法**

请按照Applied Biosystems公司的仪器使用说明书要求进行实验操作(其它类型的荧光定量PCR仪器请按照说明书操作)。

1) 按下列组份配制PCR反应液。

试剂名称	使用量		
High-throughput qPCR Mix (Taqman probe)	10ul	12.5ul	25ul
PCR Forward Primer (10 μM)	0.4ul	0.5ul	1ul
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.4ul	0.5ul	1ul
PCR Probe (10 μM)	0.2ul	0.25ul	0.5ul
DNA模板	1ul	1ul	2ul
ddH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	8ul	10.25ul	20.5ul
Total	20ul	25ul	50ul

备注:

1. 使用的探针浓度, 与使用的Real Time PCR扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关, 实际使用时请参照仪器说明书, 或各荧光探针的具体使用要求进行。
2. 在20ul反应体系中, 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的拷贝数不同, 必要时可进行梯度稀释, 确定最佳的DNA模板添加量。

3. 如果欲使用本产品进行2 Step RT-PCR反应的第二步PCR扩增反应, 第一步的RT反应液作为DNA模板时的添加量不要超过PCR反应液总体积的10%。

4. 96孔板、Single-Tube、8联Tube采用50ul反应体系, 384孔板、96-well Fast Thermal Cycling plate采用20ul反应体系。

2) 进行Real Time PCR反应。

建议采用下列显示的两步法PCR反应程序, 如果该程序得不到良好的实验结果时, 再进行PCR条件的优化。

两步法PCR扩增标准程序:

Stage 1: 预变性

Reps: 1

95℃ 2min

Stage 2: PCR反应

Reps: 40

95℃ 10秒

60℃ 30~34秒\*

\* 使用7700和7900HT时请设定在30秒。

使用7000和7300时请设定在31秒。

使用7500时请设定在34秒。

3) 实验结果分析。

反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线, 进行PCR定量时制作标准曲线等。