

## 2×Probe qPCR Mix

### 产品组成

Cat. No.	7206100	7206500
2×Probe qPCR Mix	1 ml	1 ml×5
50×ROX Reference Dye*	40 μl	200 μl
ddH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml×5
说明书	1 份	1 份

\* 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

使用Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; Applied Biosystems StepOne™, StepOnePlus™等其他需要添加高浓度ROX Reference Dye的荧光定量PCR仪时, 50×ROX Reference Dye的添加量为PCR反应体系的1/50; Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA™7, Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™等其他需要添加低浓度ROX Reference Dye的荧光定量PCR仪时, 50 × ROX Reference Dye的添加量为PCR反应体系的1/250; 下列是不需要添加ROX Reference Dye的荧光定量PCR仪: Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™, Cepheid SmartCycler®, Eppendorf Mastercycler®ep realplex , realplex 2, Illumina Eco qPCR , Qiagen/Corbett Rotor-Gene®Q , Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000, Roche Applied Science LightCycler™ 480, Thermo Scientific PikoReal Cyclers等。

### 产品储存与有效期

-20℃以下保存有效期为两年以上; 如果经常使用, 为避免反复冻融, 请于 2~8℃保存, 有效期为 6 个月。

### 技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部: e-mail: [technical@simgen.cn](mailto:technical@simgen.cn), 电话: 400-0099-857。

### 产品介绍

2×Probe qPCR Mix 是专用于探针法实时荧光定量 PCR 的两倍浓度的预混合液。产品使用了抗 Taq 抗体的热启动的 DNA 聚合酶, 与 Real Time PCR 最适的 Buffer 相组合, 可以大大提高 PCR 的扩增效率, 进行高灵敏度的 Real Time PCR 扩增反应。产品单独配置了 ROX 染料, 适用于 Applied Biosystems、Bio-Rad、Eppendorf、Roche 等市场主流的荧光定量 PCR 仪使用。本产品适合于快速 Real Time PCR 扩增反应, 可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线, 对靶基因进行准确定量、检测, 重复性好, 可信度高。

### 用户需自备的试剂和物品

1. PCR 引物及探针, DNA 或 cDNA 模板。
2. 适用于荧光定量 PCR 的单管、8 联排管、或 96 孔 PCR 管(板)。
3. 微量移液器和洁净枪头。
4. Real time PCR 扩增仪 (授权仪器)。

### 注意事项

1. 在-20℃存放的 2×Probe qPCR Mix 使用前可用手握缓慢溶解, 轻柔上下颠倒混匀直至沉淀全部消失。
2. 配制PCR反应液时, 试剂请于冰上放置并应避免强光照射。
3. 避免反复冻融本产品, 反复冻融可能使产品性能下降。
4. 配制反应液时, 请使用洁净的吸头 (推荐使用带滤芯的吸头) 和离心管, 尽量防止污染。

## 操作方法

### ◆ 应用 Applied Bio systems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 和 Step One Plus™ Real-Time PCR System 的操作方法

1. 按下列组分配制PCR反应液（反应液配制请在冰上进行）

试剂	使用量	使用量	终浓度
2×Probe qPCR Mix	10.0 μl	25.0 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	1.0 μl	0.2 μM* <sup>1</sup>
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl	1.0 μl	0.2 μM* <sup>1</sup>
探针 (10 μM)	0.4 μl	1.0 μl	0.2 μM* <sup>1</sup>
50× ROX Reference Dye * <sup>2</sup>	0.4 μl	1.0 μl	1×
DNA模板* <sup>3</sup>	2.0 μl	5.0 μl	
ddH <sub>2</sub> O	6.4 μl	16.0 μl	
Total	20.0 μl* <sup>4</sup>	50.0 μl* <sup>4</sup>	

\*1 通常引物和探针的终浓度为0.2 μM可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1~1.0 μM范围内调整引物和探针的浓度。

\*2 使用7500 Real-Time PCR System和7500 Fast Real-Time PCR System时，50 × ROX Reference Dye的添加量为PCR反应体系的1/250。使用ABI PRISM 7300 Real-Time PCR System和Step One Plus™时，50 × ROX Reference Dye的添加量为PCR反应体系的1/50。

\*3 在20μl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。如果欲使用本产品进行两步法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 按照各仪器推荐体系进行反应液配制。

### 2. 进行Real Time PCR反应

建议采用下列图表显示的两步法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。由于使用Tm值较低的引物等原因，两步法PCR反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法PCR扩增反应。有关PCR的具体反应条件请参照「实验条件的选择」。

< Applied Biosystems 7300/7500 和 Step One Plus™ Real-Time PCR System >

两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性

Reps: 1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR 反应

Reps: 40

95°C 5 秒

60°C 30~34 秒

\* 使用Step One Plus™时请设定在30秒；使用7300时请设定在31秒；使用7500时请设定在34秒。

<7500 Fast Real-Time PCR System >两步法PCR扩增标准程序：

Stage 1: 预变性

Reps: 1

95°C 30 秒

Stage 2: PCR反应

Reps: 40

95°C 3 秒

60°C 30 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。

◆ 应用LightCycler®/LightCycler®480 System Real Time PCR扩增仪的操作方法

试剂	使用量	终浓度
2×Probe qPCR Mix	10.0 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	0.2μM*1
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl	0.2μM*1
探针 (10 μM)	0.4 μl	0.2μM*1
DNA模板 (<100 ng) *2	2.0 μl	
ddH <sub>2</sub> O	6.8 μl	
Total	20.0 μl	

\*1 通常引物和探针的终浓度为0.2 μM可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1~1.0 μM范围内调整引物和探针的浓度。

\*2 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。如果欲使用本产品进行两步法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%。

2. 进行Real Time PCR反应

PCR反应用毛细管请用离心机低速离心数秒后放入LightCycler中进行Real Time PCR反应。建议采用下列图表显示的两步法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。由于使用Tm值较低的引物等原因，两步法PCR反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法PCR扩增反应。有关PCR的具体反应条件请参照「实验条件的选择」。

< LightCycler®>两步法 PCR 扩增标准程序：

Stage 1: 预变性

1 Cycle

95°C 30 秒 20°C/秒

Stage 2: PCR 反应

40 Cycles

95°C 5 秒 20°C/秒

60°C 20 秒 20°C/秒

< LightCycler®480 System>两步法 PCR 扩增标准程序：

变性: (1 cycle)

95°C 30秒 (升温速率 4.4°C/秒)

PCR: 分析模式: 定量分析(40 cycles)

95°C 5秒 (升温速率 4.4°C/秒)

60°C 30秒 (升温速率 2.2°C/秒, Acquisition Mode : Single)

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。分析方法参见仪器的操作手册。