

2×T5 Fast qPCR Mix (Probe)

■ 目录号

TSE301

■ 产品简介

本产品是采用探针法进行Real Time PCR的专用试剂,可对目的片段进行快速、高特异性的定量检测。产品中包含经抗体修饰的热启动DNA聚合酶及特别优化的反应缓冲液系统,显著提高了扩增的特异性和灵敏度,可在较宽的定量区域内得到良好的标准曲线,对靶基因进行准确地定量与检测。配套的ROX Reference Dye I/II可用于校正仪器孔间误差。本产品为浓度2×的预混液,使用时只需添加模板、引物、探针和ddH₂O,使Mix工作浓度为1×即可。

■ 产品组成

组分	规格
2× T5 Fast qPCR Mix (Probe)	5×1.0 mL
50× ROX Reference Dye I	200 μL
50× ROX Reference Dye II	200 μL

01

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

■ 产品应用

本产品适用于探针法检测及分析的荧光定量实验。

■ 产品特点

- 抗体修饰的热启动酶,灵敏度高、特异性强、稳定性好;
- 特别优化的反应缓冲液,重复性好,可信度高;
- 配有适合不同机型的ROX Reference Dye。

■ 使用方法

1.推荐PCR反应体系

组分	体积 (20 μL 体系)	终浓度
2×T5 Fast qPCR Mix (Probe)	10 μL	1×
10 μM上游引物 ^a	0.8 μL	0.4 μM
10 μM下游引物 ^a	0.8 μL	0.4 μM
10 μM探针 ^b	见标注	
模板DNA ^c	见标注	
50× ROX Reference Dye I/II ^d	0.4 μL	1×
ddH ₂ O	up to 20 μL	

a.引物推荐终浓度为0.4 μM,如有需要,可在0.2~1 μM范围进行调整;各引物终浓度应相同。

b.探针用量可参照仪器说明书或各荧光探针的使用要求;通常终浓度范围为0.1~0.5 μM,0.1 μM的终浓度适用于于大多数的应用,建议探针终浓度至少低于引物终浓度的两倍。

02

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

c.模板DNA用量因模板溶液中存在的靶基因的拷贝数不同而不同,可进行模板梯度稀释预试验得到合适的用量。若以基因组DNA为模板,推荐用量不超过1 μg;若以cDNA为模板,推荐用量不超过100 ng。

d.可根据所使用荧光定量PCR仪机型,确定是否添加ROX Reference Dye 或添加类型,如下表所示:

ROX选择	荧光定量PCR仪机型	
ROX Reference Dye I	Applied Biosystems	5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 900HT, 7900HT Fast, StepOne™, StepOne Plus™
ROX Reference Dye II	Applied Biosystems	7500, 7500 Fast, ViiA™ 7, QuantStudio 3/5/6 Flex/7 Flex/12k Flex
	Stratagene	MX4000™, MX3005P™, MX3000P™
no ROX Reference Dye	ThermoFisher	PikoReal™
	Bio-Rad	CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon2, Chromo4™
	Roche	Applied Science LightCycler® 480, LightCycler® 2.0, LightCycler® 96
	Qiagen/Corbett	Rotor-Gene®Q, Rotor-Gene®3000, Rotor-Gene®6000
	TaKaRa	Thermal Cycler Dice™ Real Time, System TP700/TP800/TP850/TP900/TP950
illumina	Eco qPCR	
Eppendorf	Mastercycler™ ep realplex, realplex 2s	

03

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

2. 推荐qPCR反应程序

步骤	温度	时间	备注
预变性 ^a	95°C	2~5 min	1 cycle
变性	95°C	10 s	40 cycles
退火/延伸 ^b	60~65°C	20~50 s	

a.若模板为cDNA,推荐预变性时间为2 min,若模板为基因组DNA,推荐预变性时间为5 min。

b.若使用2个以上的多重探针检测,推荐退火/延伸时间为50 s。

以上条件仅供参考,如有需要可进行优化。

■ 注意事项

- 本产品请勿反复冻融。
- 本产品应彻底融化并上下颠倒充分混匀后使用。建议提前混样配制反应体系,注意加样准确,避免操作失误。为了获得最佳的扩增效率,建议在冰上配制反应体系。
- 采取必要的防污染措施,使用优质的实验耗材,操作时注意更换PE手套。
- 在优化qPCR反应时,应从操作、引物、反应条件等方面进行考虑。
- 设计高质量的引物,原则如下
推荐使用Primer3web (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) 或者IDT (<http://sg.idtdna.com/Scitools/Applications/RealTimePCR/>) 等在线软件设计引物;
上下游引物T_m应相近(约60°C);
避开目的片段同源序列;
跨内含子设计,避免基因组DNA的影响;
目的片段长度控制在80~200 bp,最多不超过300 bp。

■ 保存条件

-25~-15°C保存,保质期1年,干冰运输。

■ 技术支持

公司产品使用过程中如有任何疑问与建议,欢迎随时与我们联系:

product@tsingke.com.cn。

