

产品概述

FastAmpli Premix-UNG IV (NA) (Probe qPCR) (DG) (090803)是专为冻干工艺开发的、采用探针法进行 RealTime PCR 定性、定量反应的专用试剂。含有经基因改造筛选得来的可快速扩增的 DNA 聚合酶,能在 30min 内完成整个 PCR 反应。本品经 Buffer 体系的配套优化,适用于多重扩增。本试剂含有冻干体系专用酶,经反复优化得来。本试剂采用抗抑制扩增酶与 UNG 酶的混合酶,以及含有 dUTP 的优化 Buffer 体系,不但能够实现含抑制物样品中目的基因的良好扩增,而且可以有效防止 PCR 产物残留、气溶胶污染所带来的假阳性反应。本品与多数厂家的荧光定量 PCR 仪兼容,如 Applied Biosystems、Eppendorf、Bio-Rad 和 Roche 等。本试剂冻干后具有良好的冻干形态及产品稳定性。本产品经特殊工艺处理,无 DNA 残留,可用于生物制药相关检测试剂开发。

试剂组成

1. 5×FastAmpli Premix-UNG IV (NA) (Mg²⁺ free) (DG) (090803)
2. 50×MgCl₂
3. 4×冻干保护剂 (选配)

保存条件

-20±5°C 存储;使用前应混匀,避免反复冻融。

反应条件

普通 PCR 程序				快速 PCR 程序			
步骤	温度	时长	循环数	步骤	温度	时长	循环数
消化	50°C	2 min	1	消化	50°C	2 min	1
热启动	95°C	1~5 min	1	热启动	95°C	30 s	1
变性	95°C	10~20 s	40~50	变性	95°C	1~3 s	40~45
退火延伸	56~64°C	20~60 s		退火延伸	56~64°C	3~20 s	

qPCR 反应体系配制

试剂	25 μL 体系	50 μL 体系	终浓度
5×FastAmpli Premix-UNG IV (NA) (Mg ²⁺ free) (DG) (090803)	5 μL	10 μL	1×
50×MgCl ₂	0.5 μL	1 μL	1×
4×冻干保护剂 ¹	6.25 μL	12.5 μL	1×
25×Primer-Probe Mix ^{2,3}	1 μL	2 μL	1×
Sample ⁴	---	---	---
ddH ₂ O	To 25 μL	To 50 μL	---

1. 此体系为可冻干体系,当客户使用此体系无冻干需求时,4×冻干保护剂可以选择性加入;如有冻干产品需要,在液体试剂阶段进行产品性能验证时,必需加入 4×冻干保护剂,以保证与冻干后体系组分及效果一致。
2. 使用普通 PCR 程序扩增时,通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果;反应性能较差时,可以在 0.2~1 μM 范围内调整引物浓度。通常探针浓度在 0.1~0.3 μM 范围内优化。可进行浓度梯度的实验,寻找引物和探针的最佳组合。
3. 使用快速 PCR 程序扩增时,适当提高引物探针浓度有可能获得更好的扩增结果,引物探针比例应进行配比优化。
4. 不同种类的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,确定最佳的模板添加量。

体系用于冻干时，冻干体系配制

试剂	25 μL 体系
5×FastAmpli Premix-UNG IV (NA) (Mg ²⁺ free) (DG) (090803)	5 μL
50×MgCl ₂	0.5 μL
4×冻干保护剂	6.25 μL
25×Primer-Probe Mix	1 μL
ddH ₂ O	To 18~20 μL

*如需其他体系冻干配制，请另询。

冻干条件

步骤	温度	时长	状态	压强
预冻	4°C	30 min	Hold	1 atm
	-50°C	60 min	降温	
	-50°C	180 min	Hold	
一次升华	-30°C	60 min	升温	极限真空
	-30°C	720 min	Hold	
二次升华	25°C	60 min	升温	极限真空
	25°C	300 min	Hold	

1. 此冻干工艺为 **25 μL 体系** 原位冻干工艺，如需进行冻干珠的冻干或其他体系原位冻干，请另询。
2. 以上冻干工艺仅作参考。产品类型不同、使用不同的冻干机，冻干参数有差异，使用过程中可根据实际对工艺进行调整。
3. 不同的冻干工艺有可能适用于不同的冻干批量，用于大批量生产时务必进行充分的测试验证。

冻干粉使用方法

1. 将冻干粉进行瞬时离心；
2. 向冻干粉中加入核酸模板，并加水补足至 25 μL；
3. 混匀离心，上机。

*推荐使用宝泰仪公司混匀离心一体机 CM-8 或 CM-8 Plus 进行标准化的离心混匀操作。

质量控制

1. 功能检测：qPCR 的敏感性、特异性、可重复性。
2. 无外源核酸酶活性，无外源内切、外切核酸酶污染。

技术说明

1. 本品所含 DNA 聚合酶的扩增速率不低于 1 kb/10 s。不同快速 PCR 仪其升降温速率、控温模式、导热效率差异较大，建议结合具体快速 PCR 仪，进行其最适反应条件的优化。
2. 具有更高的特异性，能够显著提升荧光定量 PCR 极限检测的灵敏度，使极低浓度模板的扩增曲线归一性、荧光值获得明显改善，适合用作高灵敏度荧光定量 PCR 检测试剂。
3. 对于退火温度较低的引物或超过 200 bp 长片段扩增建议采用三步法。
4. 不同待扩增基因对 dUTP 的利用效率和对 UNG 酶的敏感度不同，因此，如果采用 UNG 体系导致检测灵敏度下降，应对反应体系进行调整优化，如需技术支持请与我公司联系。
5. 扩增前后请使用专用的区域和移液器，戴手套操作并经常更换；PCR 反应完成后切勿打开反应管，以最大限度地减少 PCR 产物对样品的污染。