

产品概述

AcuGenix™ FastAmpli Probe qPCR Master Mix with UNG (Universal ROX)是采用探针法进行 Real Time 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 30 min 内完成 PCR 反应。本品经 Buffer 体系的配套优化,适用于多重扩增。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。

本试剂中含有通用型 ROX Reference Dye,适应于所有 qPCR 仪器,无需在不同的仪器上调整 ROX 的浓度,只需在配制反应体系时加入引物探针和模板即可进行扩增。

试剂规格与组成

组分	BR1E202-01 100 T (20 µL/T)	BR1E202-02 500 T (20 µL/T)
2×AcuGenix™ FastAmpli Probe qPCR Master Mix with UNG (Universal ROX)*	1×1 mL	5×1 mL

*本试剂已含有热启动 DNA 聚合酶、UNG、PCR Buffer、MgCl₂、dNTPs、ROX Reference Dye、稳定剂等成分。

保存条件

-20±5℃避光存储。

适用范围

用于 DNA 样本的扩增定量,可扩增所有物种来源的 DNA,样本类型可以是基因组 DNA、cDNA、质粒 DNA、λDNA 等。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途,不用于临床诊断。
2. 本试剂盒中试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀,尽量避免起泡,并经短暂离心后使用。
3. 本试剂盒中的各试剂应尽量避免反复冻融,反复冻融可能使产品性能下降,如每次使用量较少,推荐小份分装使用。
4. 反应体系配制时请于超净工作台内进行,配制过程中推荐使用专用的移液枪和带滤芯的枪头,操作人员带口罩和一次性手套并经常更换手套。
5. 由于本品中含有荧光染料 ROX Reference Dye,配制反应体系时应尽量避免强光照射。
6. 本试剂反应体系经过特殊配制,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。
7. 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。

实验流程

1. qPCR 反应体系配制

试剂	加量
2×AcuGenix™ FastAmpli Probe qPCR Master Mix with UNG (Universal ROX)	10 μL
20×Primer Probe Mix ^{1,2}	1 μL
Template DNA ³	—
ddH ₂ O	To 20 μL

1. 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。
2. 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。
3. 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。

2. 反应条件

普通 PCR 程序			
步骤	温度	时长	循环数
消化	50°C	2 min	1
预变性 ¹	95°C	1 min	1
变性 ²	95°C	10 s	40
*退火延伸 ³	56-64°C	30 s	

快速 PCR 程序			
步骤	温度	时长	循环数
消化	50°C	2 min	1
预变性 ¹	95°C	30 s	1
变性 ²	95°C	1 s	40
*退火延伸 ³	56-64°C	10 s	

1. 预变性条件适合绝大多数扩增反应, 标准程序选择 1min, 快速程序最短可选 30 秒。如模板结构复杂, 可将预变性时间延长至 3 分钟以提高预变性效果。
2. 变性: 标准程序选择 10 秒; 快速程序最短可选 1 秒。
3. 退火/延伸: 标准程序选择 30 秒; 快速程序: 对于 200 bp 以内的扩增子, 延伸时间可设为 10 秒; 超过 200 bp 时, 推荐延伸时间适当延长, 退火延伸的温度根据设计的引物 T_m 值进行调整。
4. *标注处设置信号采集。

FAQ

1. 阴性对照中观察到扩增现象?

反应体系受污染: 更换新的混合液、ddH₂O 和引物以重复实验。反应体系应在超净工作台中制备, 以减少气溶胶污染。
在绝对定量中, 标准曲线的线性关系不理想?

- (1) 移液器偏差: 增加模板的稀释倍数, 并相应增加移液体积。
- (2) 模板降解: 重新制备模板, 重复实验。
- (3) 模板浓度过高: 增加稀释倍数。

2. 在绝对定量中, 标准曲线的线性关系不理想?

- (1) 移液器偏差: 增加模板的稀释倍数, 并相应增加移液体积。
- (2) 模板降解: 重新制备模板, 重复实验。
- (3) 模板浓度过高: 增加稀释倍数。