

产品概述

Stool Direct Premix-UNG (Probe qPCR) 是专用于免除粪便样品的核酸提取纯化步骤，直接进行靶基因荧光定量（探针法）DNA 扩增检测的专用试剂。本品有很强的抑制物耐受性，无需进行 DNA 提取纯化即可用于粪便样品的直接扩增，可简化粪便样本的检测流程，同时能够保持样本的质量和完整性。此外，本试剂采用优化配方的 qPCR 专用 Buffer 和 UNG/dUTP 防污染系统，能够有效防止 PCR 产物残留、气溶胶污染导致的假阳性扩增。

试剂组成

- 50×Stool Direct Enzyme/UNG Mix
- 2×Stool Direct Premix Buffer (dUTP)

保存条件

-20℃长期保存，4℃可保存 3 个月。使用前应混匀，避免反复冻融。

qPCR 反应体系配制

试 剂	25 μ L 体系	50 μ L 体系	终浓度
2×Stool Direct Premix Buffer (dUTP)	12.5 μ L	25 μ L	1×
50×Stool Direct Enzyme/UNG Mix	0.5 μ L	1 μ L	1×
25×Primer-Probe Mix ¹	1 μ L	2 μ L	1×
Stool ^{2,3}	—	—	—
ddH ₂ O	To 25 μ L	To 50 μ L	—

- 引物终浓度通常为 0.2 μ M 时可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.2~1 μ M 范围内调整引物浓度。通常探针浓度可在 0.1~0.3 μ M 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。
- 粪便样本处理方法（参考）：1）取 0.2 g 粪便样本加入到 1 mL TE Buffer 中，充分混匀液化；2）瞬时离心后取上层粪便溶液，并将其稀释 20 倍（稀释倍数可根据扩增效果调整，可做稀释梯度测试）；3）以上所得粪便溶液作为样本直接加入反应体系中，加样量可达 20%。
- 不同检测项目中，粪便样品中所含的靶基因丰度不同，因此应根据检测灵敏度要求等实际情况确定反应体系中的最佳加样量。

反应条件

步骤	温度	时长	循环数
消化	50℃	2 min	1
热启动	95℃	1~5 min	1
变性	95℃	10~20 s	40~50
退火延伸	56~64℃	20~60 s	

质量控制

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

技术说明

货号: MD2111-DB

2×Stool Direct Premix-UNG
(Probe qPCR)

2024V01



1. 如出现荧光值过低或扩增抑制现象明显等问题, 建议减少加样量或对样品加大稀释倍数后再加样; 也可在保持加样量不变的情况下, 通过增大反应体积 (60~100 μ L) 进行改善。
2. 粪便样品的采集需按照临床标准操作要求进行; 为避免核酸降解, 可使用新鲜采集的样品。
3. 退火延伸温度应根据引物探针的 T_m 值和反应的实际情况进行优化。
4. 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。
5. 不同待检靶基因对 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。
6. 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。