

BioSmart U⁺ Melt Pro Multiplex DNA Polymerase

PM301

Version 24.1



产品概述

BioSmart U⁺ Melt Pro Multiplex DNA Polymerase是一款基于Taqman探针非对称PCR扩增技术定向开发的探针法熔解曲线专用试剂。在DNA多重扩增应用场景中，具有以下特点：1. 超多重靶标竞争性扩增导致熔曲峰值低、均一性差；2. 超多重引物、探针之间互搭以及引物与模板间的非特异性结合概率增加；3. 超多重靶标间GC含量跨度大；4. 样本类型复杂多样。针对上述特点，本产品通过BioSmart平台定向筛选出切割活性和聚合活性适配、3'端错配识别能力强、杂质耐受性强的酶，搭配高封闭率双物种抗体(结合不同抗原表位)以及优化的缓冲体系，显著提升了该产品超多重扩增后的熔曲峰值、均一性、特异性、GC含量兼容性和杂质耐受性(血液、胍盐等)。同时，试剂中引入了dUTP/UDG防污染系统，用于控制扩增产物残留污染，保证结果的准确性，是一款适用于超多重探针法熔解曲线平台的qPCR试剂。

产品组分

组 分	PM301-d1 500 U (5 U/μl)	PM301-d2 2,500 U (5 U/μl)
■ BioSmart U ⁺ Melt Pro Multiplex DNA Polymerase (5 U/μl)	100 μl	500 μl
■ 10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ Plus)	840 μl	4.2 ml
■ dNTP/dUTP Mix (10 mM each)	75 μl	375 μl
□ MgCl ₂ (100 mM)	100 μl	500 μl

保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

适用范围

本产品适用于DNA样本的扩增定量，可以扩增所有物种来源的DNA，样本类型可以是基因组DNA、质粒DNA等。

来源

Taq DNA Polymerase从包含有*Thermus aquaticus* DNA Polymerase基因的*E. coli*中表达而来。

单位定义

用活化的大马哈鱼精子DNA作为模板/引物，74°C 30 min内，摄入10 nmol的全核苷酸为酸性不溶物的活性定义为1个活性单位(U)。

注意事项

本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及非合理用途。

实验流程(以宏石SLAN 96P为测试机型)

1. 在qPCR管中配制如下混合液

组分	体积
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ Plus)	2.5 μl ■
BioSmart U ⁺ Melt Pro Multiplex DNA Polymerase (5 U/μl)	0.5 - 1 μl ■
dNTP/dUTP Mix (10 mM each)	0.5 - 0.75 μl ■
MgCl ₂ (100 mM)	0.2 - 1 μl □
Primer Mix	X μl
TaqMan Probe Mix	Y μl
Template DNA	Z μl
ddH ₂ O	Up to 25 μl

▲ 反应体系中各组分的添加量可根据以下原则自行调整:

- 依据重数进行添加量调整: 重数偏低(≤4重)时, 建议添加0.5 μl DNA Polymerase, 0.5 μl dNTP/dUTP Mix, 0.2 μl MgCl₂; 重数偏高(>4重)时, 建议添加1 μl DNA Polymerase, 0.75 μl dNTP/dUTP Mix, 0.6 μl MgCl₂。
- 10 × PCR Buffer中已含有终浓度为1.5 mM的Mg²⁺; 当a中的添加量无法有效扩增时, 建议将MgCl₂以0.1 μl为梯度上下调节用量。
- 一般来说非对称PCR反应体系中, 上下游引物比例为1:3-1:10, 终浓度为0.05-0.5 μM即可得到较好的扩增效果。当扩增性能比较差时, 可以在终浓度0.1-1.0 μM范围内调整引物浓度。
- 水解探针终浓度需大于限制性引物终浓度, 可以在0.2-0.3 μM之间调整。

▲ 加样结束后将样品充分混匀后再上机测试。

2. 按下列程序进行qPCR反应

Stage 1	污染消化	Rep: 1	37°C	2 min
Stage 2	预变性	Rep: 1	95°C	30 sec
			95°C	10 sec
Stage 3	循环反应	Reps: 45	55°C	20 sec*
			72°C	20 sec
			95°C	1 min
Stage 4	熔解阶段	Rep: 1	35°C	2 min
			35°C→90°C	0.05°C/sec*
				连续采集荧光

* 为信号采集。

▲ 退火温度需要根据引物的T_m值进行调整, 一般设置成低于引物T_m值3~5°C即可。

▲ 以上说明均为建议用量和程序, 可以根据不同体系优化用量和程序。

常见问题与解决方案

◇ 熔曲峰值过低

- 扩增曲线灵敏度差、平台值低: 产量低导致峰值低, 可适当增加MgCl₂或酶的用量。
- 扩增曲线正常: 探针消耗过大导致熔曲峰值低, 可适当降低MgCl₂或酶的用量, 也可适当增加探针用量。

◇ 阴性对照出现明显扩增或熔曲峰

- 反应体系污染: 更换新的Mix、ddH₂O、引物、探针重复实验。

◇ 实验重复性差

- 加样体积失准: 使用性能较好的移液枪; 提高模板稀释倍数, 提高加样体积。
- 定量PCR仪温度控制孔间差异大: 定期校准仪器。
- 模板浓度太低: 模板浓度越低, 重复性越差, 减少模板稀释度或提高加样体积。

◇ 扩增曲线形状异常

- 扩增曲线不光滑: 信号太弱, 经系统校正后产生; 提高模板浓度重复实验。
- 扩增曲线断裂或下滑: 模板浓度较高, 基线的终点值大于C_T值。减小基线终点(C_T值-4), 重新分析数据。
- 个别扩增曲线突然骤降: 反应管内留有气泡。处理样本时要注意离心, 进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

◇ 反应结束无扩增曲线出现

- 反应循环数不够: 一般设置循环数为45, 但需要注意的是过多的循环会增加过多的背景信号, 降低数据可信度。
- 确认引物是否降解: 长时间未用的引物应先通过PAGE电泳检测完整性, 以排除其降解的可能。
- 模板浓度太低: 减少稀释度重复实验, 一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- 模板降解: 重新制备模板, 重复实验。