

Animal Detection U⁺ Probe qPCR Super PreMix

QV114

Version 21.1



产品概述

Animal Detection U⁺ Probe qPCR Super PreMix是一款适用于DNA探针法检测的专用预混液，只需额外添加引物、探针、模板即可，使用方便。本预混液采用升级的热启动Taq酶，配合精心优化的Buffer，提高了低浓度模板的检测灵敏度，同时可以支持引物探针提前预混。本产品引入dUTP/UDG防污染系统，室温下即可发挥作用，清除体系中存在的污染，保证结果的准确性。同时，兼容快速程序，减少检测时间。

产品组分

组 分	QV114-01 (400 rxns/25 µl reaction)	QV114-02 (800 rxns/25 µl reaction)
2 × Animal Detection U ⁺ Probe qPCR Super PreMix ^a	5 × 1 ml	10 ml
50 × ROX Reference Dye 1 ^b	200 µl	400 µl
50 × ROX Reference Dye 2 ^b	200 µl	400 µl

- a. 包含dNTP/dUTP Mix, Mg²⁺, 热启动Taq酶, Heat-labile UDG等。
b. 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。使用ABI 7900HT/7300 Real-Time PCR System和StepOnePlus时使用50 × ROX Reference Dye 1; ABI 7500, 7500 Fast Real-Time PCR System, Stratagene Mx3000P使用50 × ROX Reference Dye 2; Roche, Bio-Rad的Real Time PCR仪不必使用ROX。

保存条件

-30 ~ -15℃保存, ≤0℃运输。

适用范围

适用于DNA类核酸检测。

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其他非合理用途。

实验流程(以ABI QuantStudio 3为测试机型)

1. 在qPCR管中配制如下混合液

2 × Animal Detection U ⁺ Probe qPCR Super PreMix	12.5 µl
Primer 1(10 µM)	0.5 µl
Primer 2(10 µM)	0.5 µl
TaqMan Probe(10 µM)	0.5 µl
50 × ROX Reference Dye 2	0.5 µl
Template DNA	5 µl
ddH ₂ O	5.5 µl

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整:

- ▲ 引物终浓度可以在0.1 - 1.0 µM范围内调整。
- ▲ 探针终浓度可以在50 - 250 nM之间调整。
- ▲ 模板可以进行适当体积调整。

2. 按下列条件进行qPCR反应

标准程序:

Stage 1	污染消化	Reps: 1	37℃	2 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95℃	30 sec
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95℃	10 sec
			60℃	30 sec*

*为信号采集

快速程序:

Stage 1	污染消化	Reps: 1	37℃	2 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95℃	20 sec
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95℃	1 sec
			60℃	20 sec*

*实际使用的Real Time PCR仪是否支持快速扩增循环，初次尝试请进行预实验确认。

引物设计指南

1. 引物长度 17 - 25 bp 为佳。太短的引物容易导致扩增效率降低；太长的引物会导致出现引物高级结构的几率增加。两者都会干扰定量结果的准确性。
2. 引物的GC含量控制在40% - 60%，最佳为45% - 55%。
3. 引物的Tm值应大于60℃，推荐使用Primer Premier 5进行Tm值计算。
4. 引物A、G、C、T整体分布尽量均匀，避免使用GC或者TA含量高的区域，尤其是3'端，必须避开GC含量不均匀的区域。
5. 引物设计时请尽量避开T/C或者A/G的连续结构。
6. 引物3'端最后五个碱基不能包含超过2个以上的G或者C。
7. 正向或者反向引物应尽量接近探针序列，但是不能和探针序列有重合区域。

TaqMan探针设计指南

1. 探针序列应尽量接近正向或者反向引物，但是不能与之有重合区域。
2. 探针长度一般为 18 - 40 bp。
3. 应避免连续相同的碱基出现，特别是要避免GGGG或者更多的连续G出现。
4. 探针5'端应避免使用碱基G。
5. 探针的退火温度应为65 ~ 67℃。

常见问题及解决方案

◇ 扩增曲线形状异常

- ① 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统矫正后产生；提高模板浓度重复实验。
- ② 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。
- ③ 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

- ① 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。
- ② 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段；三步法扩增程序应当将信号采集设置在72℃延伸阶段。
- ③ 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。
- ④ 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。
- ⑤ 模板降解：重新制备模板，重复实验。

◇ C_T值出现太晚

- ① 扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计合成引物。
- ② 模板浓度太低：降低稀释倍数重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- ③ 模板降解：重新制备模板，重复实验。
- ④ PCR产物太长：推荐PCR产物长度为80 - 150 bp。
- ⑤ 体系中存在PCR抑制剂：一般为模板带入，提高模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验。

◇ 阴性对照出现明显扩增

- ① 反应体系污染：更换新的Mix、ddH₂O、引物、探针重复实验。

◇ 绝对定量时标准曲线线性关系不佳

- ① 加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积。
- ② 标准品降解：重新制备标准品，重复实验。
- ③ 模板浓度太高：提高模板稀释倍数。

◇ 实验重复性差

- ① 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。
- ② 定量PCR仪温度控制孔间差异大：定期校准仪器。
- ③ 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。

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。