



qPCR MasterMix (Probe)

产品信息:

组成	MT502-01	MT502-02
qPCR MasterMix(Probe)	1ml	1ml×5
H ₂ O(RNase free)	1ml	1ml×5

储存条件: -20°C 保存。

注意: 仅供科研使用。

产品简介:

qPCR MasterMix(Probe)结合了最新的缓冲体系技术和抗体修饰的热启动 Taq 酶, 确保快速、高特异性和高灵敏度的实时荧光 PCR 检测, 适用于所有实时荧光定量PCR 仪。本试剂适用于探针 (TaqMan®, Scorpions® and molecular beacon) 检测。

qPCR MasterMix(Probe)包含所有实时荧光定量 PCR 的必要组分, 包括 dNTPs、稳定剂和增强剂, 非常方便使用。操作时, 实验人员只需添加引物, 模板和探针。

PCR 反应液配制(以 20μl 为例)

qPCR MasterMix(Probe)	10μl
10μM Forward Primer	0.8μl
10μM Reverse Primer	0.8μl
10μM Probe	0.2μl
模板	as required
H ₂ O(RNase free)	up to 20μl

灵敏度 and Ct 值:

当用我们公司的产品和其它同类产品比较时, 我们强烈推荐梯度稀释扩增试验, 直到不能检出的模板浓度, 这是检测灵敏度的唯一方法。早期的 Ct 值不能代表好的灵敏度, 只能说明扩增速度快。

PCR 扩增条件:

以下的程序适合长度 200bp 以内产物的扩增, 当然也可以根据不同情况适当调整。

Step	Temp	Time	Cycles
Polymerase activation	95°C	*2-5min	1
Denaturation	95°C	10s	40
Annealing/ Extension	60-65°C	**20-50s	

**2min for cDNA, 5min for genomic DNA*

****两个探针以上的多重荧光检测需要达到 50s**

反应结束后, 根据仪器情况可选择熔解曲线分析。

PCR优化提示:

引物和探针: 以下的建议是基于TaqMan探针的实时荧光PCR检测, 其它类型探针请参考相关资料。任何实时荧光PCR检测的特异性和扩增效率都与特定序列、引物探针浓度、和扩增子长度有关。我们强烈推荐考虑以下几点:

- 使用引物设计软件, 比如 Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 或者 visual OMP™ (<http://dnasoftware.com/>)。引物的T_m值一般在60°C左右;
- 最佳的扩增子长度在 80-200bp, 最好不要超过300bp;
- 最终引物浓度400nM 适合大部分实时荧光PCR检测, 如需测试最佳引物浓度, 我们建议梯度范围是0.2-1μM。同时引物浓度要相同。
- 最终探针浓度100nM 适合大部分实时荧光PCR检测, 我们建议探针的浓度跟引物浓度相比, 至少低两倍。

注意: 在多重实时荧光PCR检测中, 探针浓度超过100nM 会导致荧光信号交叉污染。

模板: 首先要确保模板的纯度和浓度, 其次模板不能含有PCR抑制剂(如EDTA)。模板的用量取决于DNA的类型(genomic DNA和cDNA), 以下几点需要考虑:

- **Genomic DNA:** 在单个PCR反应中, 不要超过1 μ g
- **cDNA:** 在单个PCR反应中, 我们建议使用100ng, 具体使用量根据情况调整

MgCl₂: qPCR MasterMix(Probe) 包含最优的浓度, 无需再进一步优化

PCR 质控: 在实验过程中对可能存在的污染DNA的质控非常关键, 它可能会影响你的实验数据真实性。在实验过程中一般需要包含一个阴性质控(即不加模板)。当操作两步法RT-PCR的时候, 设置一个非RT的质控对照。

ROX: qPCR MasterMix(Probe) 不包含 ROX (5-carboxy-X-rhodamine, succinimidyl ester)。

适用仪器

qPCR MasterMix(Probe)适用于所有的实时荧光定量 PCR 仪。

BM20210602