



# qPCR MasterMix (Probe)

## 产品信息:

组成	MT502-01	MT502-02
qPCR MasterMix(Probe)	1ml	1ml×5
H <sub>2</sub> 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
ddH <sub>2</sub> O	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Tm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 $\mu$ 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

**MgCl<sub>2</sub>:** 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。

BM190416