

使用说明书

GeneCopoeia™
Expressway to Discovery

GeneCopoeia Inc.
19520 Amaranth Drive
Germantown, Maryland 20874
USA
Tel: 301-515-6982; 1-866-360-9531
Fax: 301-515-6983
Web: www.genecopoeia.com

2× AllinOne™ Q-PCR Mix

产品套装编号: D0101A, 本套装包含以下产品:

产品内容	产品编号	包装规格
2× AllinOne™ Q-PCR Mix	D01010A	1ml× 2(200次反应)
50× ROX Reference Dye	D01011A	80µl

保存条件: -20 °C

■ 产品概述

本产品是采用PCR技术结合SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时荧光定量PCR (Real-Time PCR)的专用试剂, 产品中包含DNA聚合酶、反应Buffer、dNTP和SYBR Green I, 使用时只需加入模板和引物即可进行Real-Time PCR实验, 操作快捷方便。

本产品适合现有市场上几乎所有Real-Time PCR仪, 产品附带的ROX Reference Dye可以使用于需要ROX参比荧光的仪器。

■ 产品原理

1、PCR技术

本产品中的DNA聚合酶是经特殊修饰的DNA聚合酶, 此热启动酶结合优化的反应Buffer能有效地抑制非特异扩增产物的产生, 极大地提高了PCR的扩增效率和检测灵敏度。

2、SYBR Green I 嵌合荧光

SYBR Green I 是一种荧光染料, 能特异地掺入到DNA双链分子的小沟部位, 发出荧光信号。在PCR 反应体系中, SYBR Green I 染料与DNA双链分子结合发出荧光, 通过检测反应进程中SYBR Green I的荧光强度, 达到检测PCR产物扩增量的目的。同时在PCR结束后可以直接进行融解曲线分析, 从而判断是否存在变异或非特异性扩增产物。

■ 注意事项

- 1、此产品应在-20°C避光保存, 避免在4°C或室温存放。
- 2、使用前请缓慢颠倒混匀试剂, 避免起泡, 并经短暂离心后再使用。
- 3、配制PCR反应液时请使用PCR级水, 同时避免强光照射。
- 4、为尽可能减少核酸扩增污染, 请严格遵守标准PCR流程。

■ 操作说明

- 1、取出2×AllinOne™ Q-PCR Mix (如有必要, 取出50×ROX Reference Dye), 上下轻缓颠倒混匀, 在配制前进行短暂离心。

2、PCR反应液配制(例) (冰上操作)

试剂组分	体积	终浓度
2×AllinOne™ Q-PCR Mix	10μl	1×
ddH ₂ O	1μl	
PCR Forward Primer (4μM)	2μl	0.4μM
PCR Reverse Primer (4μM)	2μl	0.4μM
Template	5μl	
Total	20μl	

- * 将2×AllinOne™ Q-PCR Mix设定为总反应体积的一半，其它组分请按最适当比例调整。如果要变更总反应体积，请保持最适条件下各组分的比例。
 - * 引物是Real-Time PCR的重要因素。在引物设计时，建议使用Oligo、Primer Premier等引物设计软件。在PCR反应时，引物浓度通常在0.2μM至0.6μM范围内调整，一般浓度为0.4μM时能得到较好的结果。扩增效率不高时，可适当增加引物用量，但引物太多，可能会导致非特异性扩增产物增加。
 - * DNA模板的添加量通常在100ng以下，因不同种类的DNA模板中含有的靶基因拷贝数不同，必要时可以进行梯度稀释，确定最佳的DNA模板添加量。如使用反转录cDNA作为模板，请稀释后再使用。原液也可以用，但cDNA反转录体系对定量可能会产生影响。
- 3、充分混匀PCR反应液，添加至PCR反应管中。
 - 4、进行短暂离心，确保所有试剂流到反应管底部。
 - 5、PCR反应程序，建议使用标准的三步法：

循环数	步骤	温度	时间	检测
1	预变性	95℃	10min	off
	变性	95℃	10sec	off
40	退火	55℃~60℃	20sec	off
	延伸	72℃	15sec	on

对于利用SYBR Green I检测的 Real-Time PCR都需要进行融解曲线分析，所以PCR循环结束后要求立即进行融解曲线设计的实验设计，下面以Bio-Rad的Chromo4为例进行设计：

温度	温度间隔	时间	检测
72℃~95℃	0.3℃	1sec/次	on
40℃		1min	off

- * 产品采用的DNA聚合酶为经过修饰的热启动酶，95℃ 10min能充分激活酶活性。
- * 退火温度应该结合引物的T_m在55℃~60℃进行调整。引物结合的最佳值可能超出此范围，可以根据实际情况进行调整。
- * Real-Time PCR 扩增的片段最佳长度为80~150bp，可以适当延长至300bp。

■ 数据分析

根据实验设计进行必要的数据分析，具体操作参考所使用的仪器说明书。

■ 实验示例

实验目的：通过梯度稀释质粒DNA，制作标准曲线，来判定AllinOne™ Q-PCR Mix的扩增效率和检测灵敏度，其中检测片段长度为102bp。

使用仪器：Chromo4 (Bio-Rad)

操作流程：

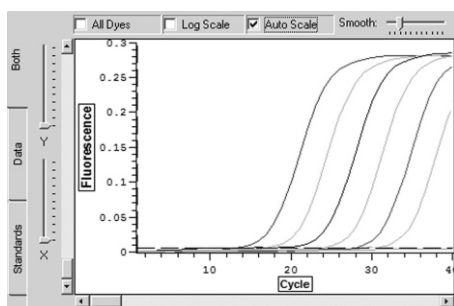
- 1、将质粒按10的倍数稀释成 10^5 分子/ μl ~1 分子/ μl 共6个浓度梯度。
- 2、配置PCR反应液（冰上操作）

试剂组分	体积
2×AllinOne™ Q-PCR Mix	10 μl
PCR forward Primer (4 μM)	2 μl
PCR Reverse Primer (4 μM)	2 μl
ddH ₂ O	1 μl
反应液mix	15 μl

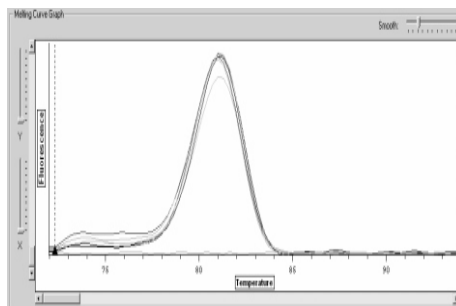
- 3、充分混匀PCR反应液mix，短暂离心后添加至PCR反应管中。
- 4、添加稀释后的质粒模板5 μl 至各个反应管中，阴性对照使用5 μl 的灭菌水替代模板。
- 5、设置 PCR 反应条件及其融解曲线读取条件：

循环数	步骤	温度	时间	检测
1	预变性	95℃	10min	off
	变性	95℃	10sec	off
45	退火	56℃	20sec	off
	延伸	72℃	15sec	on
	融解曲线读取	72℃~95℃	0.3℃/次.sec	on
	冷却	40℃	1min	off

- 6、实验结束后，分析扩增曲线及其融解曲线：

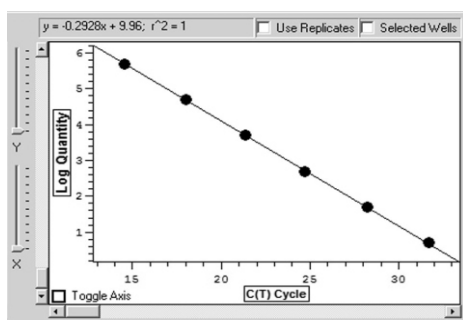


质粒DNA梯度稀释扩增曲线



扩增产物融解曲线峰

7、由各扩增曲线所得到的Ct值，进行标准曲线的制作。



标准曲线图

8、实验结论

从扩增曲线及其融解曲线峰分析可知：以质粒DNA为模板，可以检测到低至5个分子的拷贝数，产物单一，说明AllinOne™ Q-PCR Mix具有极高的检测灵敏度；同时从标准曲线可以看出其检测的各个浓度间线性关系良好，说明其具有优良的扩增效率。

■ 常见问题及对策

1、扩增曲线混乱

- * 荧光检测时的温度设定不恰当，请调整到合适的温度。
- * 样品位置设定错误，请设定正确的样品位置再进行分析。
- * PCR循环条件、引物浓度、序列等不恰当，请调整引物浓度或改善退火温度进行尝试，仍不能改善结果，建议重新设计引物。
- * 样品纯度不好，应对样品进行苯酚抽提或乙醇沉淀等方法进行纯化处理，如果样品为cDNA，最好稀释后再用，因为反转录体系对PCR反应有一定的影响。

2、定量值重复性差

- * 仪器故障，因为仪器的不适用，在温度的管理或检测方面重复性差，应根据相应仪器的说明书进行检测。
- * 样品纯度不好，不纯的样品会导致实验的重复性差，请使用纯化过的DNA样品，并在使用前充分混匀样品，对于cDNA样品，最好稀释后再用。
- * PCR循环条件、引物浓度、序列等不恰当，扩增效率差的PCR反应容易产生重复性差的结果，请调整引物浓度或退火温度来提高扩增效率，扩增不好时，应尝试降低退火温度或提高引物浓度，仍不能改善建议重新设计引物。

3、融解曲线异常

- * 空白样品中有信号
 - A 如果空白对照所对应融解曲线的T_m与阳性对照一致，说明PCR反应体系可能有污染或其为阳性样品，为此应首先排除其是否为加样误差，如仍有相同情况，应更换PCR级水、引物或启用新的2×AllinOne™ Q-PCR Mix。
 - B 如果空白对照所对应融解曲线的T_m值比阳性对照低，说明可能产生了引物二聚体等的非特异性扩增。为此建议PCR反应液配置应在冰上进行，并提高荧光检测时的温度。如不能改善，应重新设计引物。
- * 阳性对照的融解曲线出现双峰或多峰
阳性对照的融解曲线出现双峰或多峰现象，说明产生了非特异性扩增片段。建议PCR反应液配置应在冰上进行，并提高退火温度，如不能改善，应重新设计引物。

4、无信号值 (Ct) 出现或出现较晚

- * 反应循环数不够。一般为35个循环以上，但高于45个循环会增加过多的背景信号。
- * 模板量不足、降解或模板中所检测序列含量低。建议对未知浓度的样品应从系列稀释样品的最高浓度做起，同时避免反复冻融样品。
- * 扩增效率低，反应条件不够优化。建议设计更好的引物，优化反应条件。

▶ 生产经销商：广州复能基因有限公司



复能基因
FulenGen

广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器D区8楼 (邮编: 510663)

技术热线: 020-32068595 电子邮箱: support@fulengen.com 网址: www.fulengen.com