

Hieff Unicon[®] qPCR TaqMan Probe Master Mix

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Hieff Unicon [®] qPCR TaqMan Probe Master Mix	11205ES03	1 mL
Hieff Unicon [®] qPCR TaqMan Probe Master Mix	11205ES08	5 mL
Hieff Unicon [®] qPCR TaqMan Probe Master Mix	11205ES25	25 mL

产品描述

本产品是探针法 2×实时定量 PCR 扩增的预混合溶液。采用的抗体法热启动 UNICON[®] DNA 聚合酶（货号：10113ES）可以有效抑制引物非特异性退火导致的扩增。同时，配方优化了有效抑制非特异性 PCR 扩增的因子和提升 PCR 反应扩增效率的因子，适合低浓度模板的扩增，使定量 PCR 可以在宽广的定量区域内获得良好的标准曲线。

产品组分

组分编号	组分名称	产品编号/规格		
		11205ES03 (1 mL)	11205ES08 (5 mL)	11205ES25 (25 mL)
11205-A	Hieff Unicon [®] qPCR TaqMan Probe Master Mix	1 mL	1 mL × 5	25 mL
11205-B	50×Low Rox	40 μL	200 μL	1 mL
11205-C	50×High Rox	40 μL	200 μL	1 mL

运输与保存方式

冰袋运输。-20℃避光储存，有效期 18 个月。本品避免反复冻融。建议分装保存。

反应体系

组分	体积 (μL)	体积 (μL)	终浓度
Hieff Unicon [®] qPCR TaqMan Probe Master Mix	10	25	1×
Forward Primer (10 μM)	0.4	1	0.2 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.4	1	0.2 μM
TaqMan Probe (10 μM)	0.2	0.5	0.1 μM
50×High or Low Rox	0.4	1	1×
模板 DNA	X	X	-
无菌超纯水	to 20	to 50	-

【注】： 使用前务必充分混匀，避免剧烈震荡产生过多气泡。

- 参比染料：** Rox 的添加，可根据不同仪器型号进行选择，具体可参考【适用机型】。
- 引物浓度：** 通常引物终浓度为 0.2 μM，也可以根据情况在 0.1-1.0 μM 之间进行调整。
- 探针浓度：** 探针终浓度在 50 nM-250 nM 之间。
- 模板浓度：** 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。
- 模板稀释：** cDNA 原液建议 5-10 倍稀释，最佳模板加入量以扩增得到的 CT 值在 20-30 个循环为好。
- 反应体系：** 推荐使用 20 μL 或 50 μL，以保证目的基因扩增的有效性和重复性。
- 体系配制：** 请于超净工作台内配制，并使用无核酸酶残留的枪头、反应管；推荐使用带滤芯的枪头。避免交叉污染和气溶胶污染。

扩增程序（两步法程序）

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	1 min	1
变性	95°C	10 sec	40
退火、延伸	60°C	30 sec	

- 【注】**
- 预变性时间：**根据不同模板和引物的具体情况可适当增加预变性时间至 3 - 5 min。
 - 退火温度和时间：**建议在 56-64°C 范围内调整。如果反应效果不好，可以适当延长反应时间。
 - 荧光信号采集：**请参考仪器设置。

结果分析

定量实验至少需要三个生物学重复。

反应结束后需要确认扩增曲线。进行 PCR 定量时，需要制作标准曲线。

反应特异性需要琼脂糖凝胶电泳确认。

引物设计指南

- 推荐引物长度 25 bp 左右。扩增产物长度 150 bp 为佳，不要低于 100 bp，可以在 100 bp-300 bp 内选择。
- 正向引物和反向引物的 T_m 值相差不宜超过 2°C。
- 引物碱基分布要均匀，避免出现连续的 4 个相同碱基，GC 含量控制在 50% 左右。3' 端最后一个碱基最好为 G 或 C。
- 引物内部或者正反两条引物间最好避免出现有 3 个碱基以上的互补序列。
- 引物特异性需要用 NCBI BLAST 程序进行核对。避免引物 3' 端有 2 个碱基以上的非特异性互补。

TaqMan 探针设计指南

- 探针长度一般为 18-40 bp。探针序列应尽量接近正向或者反向引物，但不能与之有重合区域。
- 探针的退火温度应为 65-67°C。
- 引物碱基分布要均匀，避免出现连续的 4 个相同碱基。探针 5' 端应避免使用碱基 G。
- 若序列中包含多态性位点，应使其位于探针序列中间。

适用机型

High Rox 适用机型： ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT Fast, StepOne™, StepOne Plus™;

Low Rox 适用机型： ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio™ 3 and 5, QuantStudio™6,7,12k Flex;
Stratagene MX3000P™, MX3005P™, MX4000P™;

不需要 Rox 校正的仪器型号：

Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon® 2, Chromo4™;

Eppendorf Mastercycler® ep realplex, realplex 2 s;

Qiagen Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000;

Roche Applied Science LightCycler® 480, LightCycler® 2.0; Lightcycler® 96;

Thermo Scientific PikoReal Cycler;

Cepheid SmartCycler®; **Illumina** Eco qPCR.