

版本号: FP131111

TIANTough Genotyping qPCR PreMix (Probe)

TIANTough基因分型PCR试剂 (探针法)

目录号: FP211

产品内容

试剂盒组成	FP211-01	FP211-02
	20 μ l \times 125 rxn	20 μ l \times 500 rxn
2 \times TIANtough Genotyping PreMix (Probe)	1.25 ml	4 \times 1.25 ml
50 \times ROX Reference Dye	250 μ l	1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2 \times 1 ml	5 \times 1 ml

保存条件

收到本产品后, 请立即置于-20 $^{\circ}$ C 避光保存, 在该条件下避光可保存2年。从-20 $^{\circ}$ C 取出使用时, 将冻存的2 \times TIANtough Genotyping PreMix (Probe)和50 \times ROX Reference Dye溶解, 然后轻轻颠倒混匀, 待溶液完全均一后再行使用。如解冻后没有使用, 须彻底混匀后重新冷冻(在解冻过程中盐会出现分层现象, 未混匀进行冷冻, 盐晶体的析出将会对酶造成损害)。如需一段时间内经常取用, 可在2~8 $^{\circ}$ C 条件下储存3个月。避免反复多次冻融。

产品简介

TIANTough Genotyping qPCR PreMix (Probe) 是一款专门应用于探针法SNP检测的即用型2 \times 浓度的热启动PCR预混试剂。该预混试剂含有特异的抗体修饰Taq DNA聚合酶, 能有效检测极低丰度的DNA模板。精心配制的独特PCR缓冲液能有效消除众多PCR抑制剂对PCR的抑制及对荧光信号淬灭的影响, 对SNP鉴定有很好的特异性和扩增效率。

试剂盒特点

1. 防弹式基因分型---轻松屏蔽PCR抑制剂对SNP分型的影响
2. 快速反应---对多数实验能够执行快速PCR操作
3. 荧光信号强---强劲的SNP分型仅需少量的引物探针
4. 避免操作失误---添加蓝色指示染料，监控实验添加过程

试剂盒原理

1. 本产品适用于水解探针法进行模板的荧光定量PCR和SNP检测，该产品可以克服PCR反应液中的抑制因子，特别是对粗提样本，其表现出高度的抗逆性。适用于植物，动物，以及一些环境样本的粗提液。
2. 2×TIANtough Genotyping PreMix (Probe)中特异的抗体修饰热启动Taq DNA聚合酶，95℃条件下仅需2~5分钟即可激活全部酶活，减少了反应时间，同时最大限度的减少PCR扩增全程中的非特异性扩增，配合精心优化的buffer体系，使该产品对于序列变异的鉴定有很好的特异性和扩增效率。
3. 2 × TIANtough Genotyping PreMix (Probe)包含dNTPs，增强剂，稳定剂等以提高产物特异性和反应灵敏度，并包含一种微蓝色的指示染料，该染料对PCR反应以及探针荧光没有任何影响；使操作更加方便，避免大量样本小体系（10 μl体系）操作过程中容易产生的加样错误。

注意事项

1. 如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。使用时请上下颠倒轻轻混匀，请不要使用振荡器进行混匀，尽量避免出现泡沫，并经瞬时离心后使用。
2. 本产品中不含有荧光探针。
3. 引物终浓度为300 nM，探针终浓度为200 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。需要进一步优化引物浓度的，可以在100-900 nM范围内调整；需要进一步优化探针浓度的，可以在100-250 nM范围内调整。
4. 20 μl反应体系中，基因组DNA模板的使用量一般小于100 ng。

操作方法

<1> 建立Real-Time PCR反应体系:

1. 溶解FastFire qPCR PreMix (如果保存在-20℃), ROX Reference Dye, 模板, 引物、探针和RNase-Free ddH₂O, 并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀。
2. 建议置于冰上进行Real-Time PCR反应液的配制。

反应体系:

组成成分	20 μl 体系	终浓度
2 × TIANtough Genotyping PreMix (Probe)	10 μl	1 ×
正向引物 (10 μM) Δ1	0.6 μl	100-900 nM
反向引物 (10 μM) Δ1	0.6 μl	100-900 nM
探针 (10 μM) Δ2	0.4 μl	100-250 nM
模板	2 μl	—
50 × ROX Reference Dye Δ3	—	—
RNase-Free ddH ₂ O	至20 μl	—

Δ1 引物终浓度为300 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时, 可增加PCR反应体系中的引物浓度; 发生非特异扩增时, 可适当减少PCR反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的, 可以在100-900 nM范围内调整。

Δ2探针的浓度与使用的Real-Time PCR扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关, 实际使用时请参照仪器说明书, 或各荧光探针的具体使用说明进行。通常探针终浓度为200 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。需要进一步优化探针浓度的, 可以在100-250 nM范围内调整。

Δ3几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表:

仪器	终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/Step One等	5 × (例如: 5 μl ROX/50 μl体系)
ABI 7500、7500 Fast; Stratagene Mx3000P、Mx3005P和Mx4000等	1 × (例如: 1 μl ROX/50 μl体系)
Roche仪器, Bio-Rad仪器, Eppendorf仪器等	无需添加

3. 盖上反应管, 轻柔混匀。可短暂离心, 确保所有组分均在管底。
4. 将反应体系置于荧光定量PCR仪中, 开始反应。

<2>进行Real-time PCR反应

建议采用两步法PCR反应程序进行反应；若模板量较低等因素导致扩增效果不佳，可使用三步法程序进行PCR反应。

两步法反应程序：

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C	2 min Δ 1	预变性	否
PCR反应	40×	95°C	15 sec	变性	否
		60°C	30 sec Δ 2	退火/延伸	是

三步法反应程序：

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C	5min Δ 1	预变性	否
PCR反应	40×	95°C	15 sec	变性	否
		50-60°C	15 sec	退火	否
		72°C	30sec Δ 2	延伸	是

Δ 1 解链时间的长短与模板的长度和GC含量有关

Δ 2 使用不同型号仪器进行时间设定时，请按照仪器使用说明书要求进行实验操作，几种常见仪器的时间设定见下表：

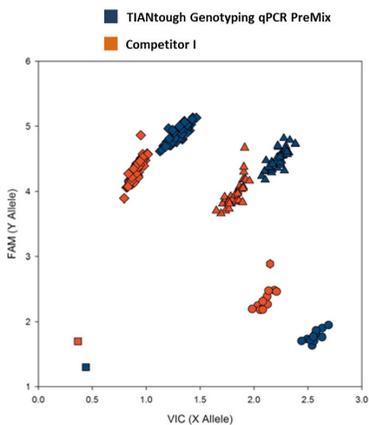
使用Roche, ABI 7500 Fast, BioRad和Agilent等公司荧光定量PCR仪时请设定在15sec。

使用ABI 7900HT/7900HT Fast/ViiA 7/StepOne/StepOnePlus时请设定在20 sec。

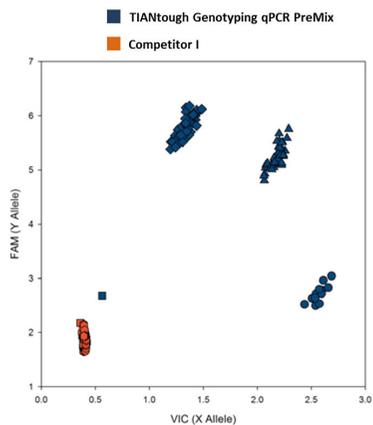
使用ABI 7000和7300时请设定在31 sec。

使用ABI7500时请设定在32 sec。

反应举例



A 与Competitor I相比，TIANtough在低浓度模板条件下表现出更强的荧光信号和更紧密的聚簇效果。



B 在PCR抑制剂腐殖酸（50ng/ μ l）作用下，Competitor I的PCR扩增被完全抑制，而TIANtough依然表现出精确的结果。

常见问题

1. 低浓度模板时扩增曲线混乱，荧光强度变弱

原因	解决办法
目标DNA的拷贝数过少	反应液中的目标DNA拷贝数只有几倍到几十倍时，拷贝数散乱的概率变大，容易形成线性混乱。请适当提高样品浓度再进行反应。
	目的片段扩增的同时出现引物二聚体的扩增，由于竞争使目的片段的扩增反应变弱。请摸索反应条件或重新设计引物，以防止引物二聚体的形成。
DNA被反应离心管吸附而损失	模板浓度较低或样品稀释后长时间存放时，会导致DNA被反应离心管吸附而损失。请提高样品浓度再进行反应。如果对样品进行稀释，建议稀释后立即进行反应。

2. 重现性差

原因	解决办法
仪器方面的故障	因为仪器的不适用，在温度管理或检测时产生重现性差。请根据相应仪器的说明书进行点检。
样品纯度不好	不纯的样品会导致实验的重现性差。
稀释的模板放置太久	浓度较低的DNA溶液存放时间较长时，由于被管壁吸附从而实际浓度会更低，建议从原液重新稀释后再进行反应。
	另外，通过梯度稀释的标准样品最好每次使用时直接从原液稀释。
引物或探针质量下降	尽量避免新合成引物批次间的差异，可以使用原来质量好的引物做为对照。
PCR 反应条件、引物浓度、序列等不恰当	扩增效率差的PCR 容易产生重现性差。通过变更引物和探针的浓度或PCR 反应条件来进行调整。扩增不好时，一般可降低退火温度或提高引物浓度，也可以延长延伸时间。如模板的GC含量较高，可延长变性时间。仍得不到改善时，建议重新设计引物和探针。
计量误差	反应体积太小会导致检测精度下降。请根据定量PCR仪推荐的反应体积重新实验。

3. NTC可见扩增

原因	解决办法
发生交叉污染	请更换新的试剂或灭菌水。仍无法得到改善时，
	请尝试到新的实验环境进行操作。
仪器设定误差 (多重PCR)	当使用几种荧光探针时，请正确设定荧光测定，
	防止出现因不同染料的光谱交叉而导致的检测信号差异。

4. 扩增曲线荧光信号很弱，或扩增曲线呈锯齿状

原因	解决办法
检测光光谱设定误差	由于目前不同荧光定量PCR仪的原理和提供的检测光光谱范围的差异，因此在选择探针的发光基团和淬灭基团时一定要根据所用的仪器型号设置的可检测的荧光信号范围内选择。请参照仪器的使用说明书，重新确定参数设置。
	请使用HPLC级别以上纯化的Probe，否则残留的未结合的荧光染料会造成基线上飘，从而导致扩增产物所产生的荧光值变低。
	由于探针保存中分解导致基线上飘，从而导致扩增产物所产生的荧光值变低。此外，一部分荧光染料不适合含有EDTA的buffer进行保存。请按照Probe合成公司推荐的保存条件。
荧光探针质量较差	对部分仪器，需要更长的延伸时间来充分采集荧光。扩增曲线锯齿状较明显时，将延伸时间设定为45-60 sec可得到改善。
荧光采集时间太短	

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品