使用前请仔细阅读说明书　　版本号：202010

2×Probe qPCR Mix

目录号：EH002　**规格：**1 ml　**保存：**-20℃保存，有效期至少一年。

产品简介：

本产品是采用探针法进行 Real Time PCR 的专用试剂，含有抗体封闭型热启动酶，能够有效抑制低温条件下引物非特异性退火或者引物二聚体引起的非特异性扩增，提高扩增反应的特异性。本产品具备较高的扩增效率和检测灵敏度，可以在较宽的定量区域内得到良好的标准曲线，准确进行定量，同时与多数厂家的荧光定量 PCR 仪兼容，如 Applied Biosystems、Eppendorf、Bio-Rad 和 Roche 等。

试剂内容：

2×Probe qPCR Mix　　1 ml

自备：

ROX Reference Dye I（50×）

ROX Reference Dye II（100×）

注意：

ROX Reference Dye 用以校正部分公司 Real Time PCR 扩增仪的孔间荧光信号误差。

ROX Reference Dye I (50×) 适用于：ABI PRISM 7000/ 7700/ 7300/ 7900HT、Step One Plus Real-Time PCR System。

ROX Reference Dye II (100×) 适用于：7500 Real-Time PCR System、7500 Fast Real -Time PCR System、Stratagene Mx3000P、Mx3005P、Mx4000。

ROX Reference Dye I、II 反应终浓度均为 1×。

LightCycler、Thermal Cycler Dice Real Time System II、Smart Cycler System 等 Real Time PCR 扩增仪不需使用。

操作方法：

1）配制 PCR 反应体系：

解冻后使用前应充分颠倒混匀，瞬时离心后使用，避免产生大量气泡。避免反复多次冻融，若经常使用请保存在 4℃。按下列组份配制 PCR 反应液（反应液配制请在冰盒上进行）：

Web: www.sanshibio.com
Email: sanshibio@126.com
Tel : 0311-82970259

试剂	25 μl 体系	终浓度
2×Probe qPCR Mix	12.5 μl	1×
Primer 1 (10 μM)	0.5-2.5 μl	0.2-1.0 μM
Primer 2 (10 μM)	0.5-2.5 μl	0.2-1.0 μM
Probe	1 μl	-
ROX Reference Dye I or ROX Reference Dye II	0.5 μl or 0.25 μl	1×
Template DNA	5 μl	-
ddH_2O	Up to 25 μl	-

注意：

1、使用的引物终浓度可在 0.2～1.0 μM 范围内调整，DNA 模板可根据浓度进行适当调整。

2、使用的探针浓度可在 0.1-0.3 μM 范围内优化。可进行浓度梯度的实验，寻找引物和探针的最佳组合。探针的使用与 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，请参照仪器说明书或各荧光探针的具体使用要求进行调整。

3、对于退火温度较低的引物或超过 200 bp 的长片段扩增，建议采用三步法。

4、扩增前后要使用专用的区域和移液器，戴手套操作并经常更换，PCR 反应完成后切勿打开反应管。以最大限度的减少 PCR 产物对检测环境的污染。

2）PCR 反应程序：

通常情况下，可以采用两步法进行反应；如果两步法扩增不理想，可以采用三步法设置 PCR 反应程序。

方法/步骤	两步法 real-time PCR	三步法 real-time PCR	循环数
95℃（预变性）	2-5 min	2-5 min	1
95℃（变性）	10-20 sec	10-20 sec	35-45 Cycles
55℃-60℃（退火）	20 sec - 1 min（采集荧光）	10-20 sec	
72℃（延伸）	—	20 sec - 1 min（采集荧光）	

请根据引物选择合适的退火（延伸）温度。通常引物的 T_m 值设计在 60℃左右。

3）实验结果分析：

反应结束后，对实验结果进行分析。详细分析方法参见 Real Time PCR 扩增仪操作手册。

Web: www.sanshibio.com
Email: sanshibio@126.com
Tel : 0311-82970259