货号：BR1E203

AcuGenix™ FastAmpli Probe qPCR Master Mix (Universal ROX) V03

产品概述

AcuGenix™ FastAmpli Probe qPCR Master Mix (Universal ROX)是采用探针法进行 Real Time PCR 定性、定量反应的专用试剂，含有经基因改造筛选得来的可快速扩增的 DNA 聚合酶，能在 30 min 内完成 PCR 反应。本品经 Buffer 体系的配套优化，适用于多重扩增。本试剂采用抗抑制扩增酶以及优化 Buffer 体系，可以实现含抑制物样品中目的基因的良好扩增。本品与多数厂家的荧光定量 PCR 仪兼容，如 Applied Biosystems、Eppendorf、Bio-Rad 和 Roche 等。

本试剂中含有通用型 ROX Reference Dye，适应于所有 qPCR 仪器，无需在不同的仪器上调整 ROX 的浓度，只需在配制反应体系时加入引物和模板即可进行扩增。

试剂组成

组分	BR1E203-01 100 T (20 μL/T)	BR1E203-02 500 T (20 μL/T)
2×AcuGenix™ FastAmpli Probe qPCR Master Mix (Universal ROX)*	1×1 mL	5×1 mL

*本试剂已含有热启动 DNA 聚合酶、PCR Buffer、$MgCl_2$、dNTPs、稳定剂等成分。

保存条件

-20±5℃避光存储。

适用范围

用于 DNA 样本的扩增定量，可扩增所有物种来源的 DNA，样本类型可以是基因组 DNA、cDNA、质粒 DNA、λDNA 等。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途，不用于临床诊断。
2. 本试剂盒中试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
3. 本试剂盒中的各试剂应尽量避免反复冻融，反复冻融可能使产品性能下降，如每次使用量较少，推荐小份分装使用。
4. 反应体系配制时请于超净工作台内进行，配制过程中推荐使用专用的移液枪和带滤芯的枪头,操作人员佩戴口罩和一次性手套并经常更换手套。
5. 本试剂反应体系经过特殊配制，具有更高的特异性，能够显著提升荧光定量 PCR 极限检测的灵敏度，使极低浓度模板的扩增曲线归一性、荧光值获得明显改善，适合用作高灵敏度荧光定量 PCR 检测试剂。
6. 对于退火温度较低的引物或超过 200 bp 长片段扩增建议采用三步法。

实验流程

1. qPCR 反应体系配制

试剂	加量
2×AcuGenix™ FastAmpli Probe qPCR Master Mix (Universal ROX)	10 μL
20×Primer Probe Mix[1,2]	1 μL
Template DNA[3]	——
ddH_2O	To 20 μL

1. 使用普通 PCR 程序扩增时，通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果；反应性能较差时，可以在 0.2-1 μM 范围内调整引物浓度。通常探针浓度在 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。

2. 使用快速 PCR 程序扩增时，适当提高引物探针浓度有可能获得更好的扩增结果，引物探针比例应进行配比优化。

3. 不同种类的模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的模板添加量。

2. 反应条件

普通 PCR 程序			
步骤	温度	时长	循环数
预变性 [1]	95℃	1 min	1
变性 [2]	95℃	10 s	40
*退火延伸 [3]	56-64℃	30 s	

快速 PCR 程序			
步骤	温度	时长	循环数
预变性 [1]	95℃	30 s	1
变性 [2]	95℃	1 s	40
*退火延伸 [3]	56-64℃	10 s	

1. 预变性条件适合绝大多数扩增反应，标准程序选择 1min，快速程序最短可选 30 秒。如模板结构复杂，可将预变性时间延长至 3 分钟以提高预变性效果。

2. 变性：标准程序选择 10 秒；快速程序最短可选 1 秒。

3. 退火/延伸：标准程序选择 30 秒；快速程序：对于 200 bp 以内的扩增子，延伸时间可设为 10 秒；超过 200 bp 时，推荐延伸时间适当延长或采用三步法，退火延伸的温度根据设计的引物 Tm 值进行调整。

4. *标注处设置信号采集。

FAQ

1. 阴性对照中观察到扩增现象？

反应体系受污染：更换新的混合液、ddH_2O 和引物以重复实验。反应体系应在超净工作台中制备，以减少气溶胶污染。

2. 在绝对定量中，标准曲线的线性关系不理想？

(1) 移液器偏差：增加模板的稀释倍数，并相应增加移液体积。

(2) 模板降解：重新制备模板，重复实验。

(3) 模板浓度过高：增加稀释倍数。