

## Taq-HS Probe qPCR Premix (None/Low/High ROX)

REF: EG20118/ EG20119/ EG20120-M

### 储运条件

长期保存请于 -20°C 避光保存, Mix 融解后可在 4°C 避光条件下稳定存放一个月, 尽量避免反复冻融。

### 产品组成

组分	规格
Taq-HS Probe qPCR Premix (None ROX)	5×1 ml
Taq-HS Probe qPCR Premix (Low ROX)	5×1 ml
Taq-HS Probe qPCR Premix (High ROX)	5×1 ml

### 产品简介

Taq-HS Probe qPCR Premix 是基于独特的双组份热启动 Taq 聚合酶开发的实时定量 PCR 用 2× 预混液。本产品已包含除引物和样品 DNA 以外的所有荧光定量 PCR 组分, 可减少操作步骤, 缩短加样时间, 降低了污染几率, 适用于以 cDNA 或 DNA 为样品的 TaqMan 探针法检测。

由于部分品牌型号荧光定量 PCR 仪的设计原因, 这些仪器 PCR 孔之间的荧光信号存在微小差异, 因此需要加入参考染料 (Reference Dye) 加以校正。本系列产品配有不同浓度的 ROX Reference Dye, 请根据不同机型针对性选用。

### 使用方法

#### 1. 适配机型

产品	适用机型
EG20118S (None Rox)	Bio-Rad CFX 全系列; Roche LightCycler™ 系列; Eppendorf Mastercycler® ep realplex 系列; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® 系列; Takara Thermal Cycler Dice; analytikjena qTOWER 系列等
EG20119S (Low Rox)	ABI 7500/7500 Fast, ABI ViiA 7™; ABI QuantStudio™ 系列; Stratagene Mx3000P®/3005P™/4000™
EG20120S (High Rox)	ABI 7000/7300/7700/7900 HT/7900 HT Fast, StepOne™, StepOne Plus™ 等

#### 2. 使用注意

- ① 因 Mix 中预混有染料, 其保存或反应体系配制过程应避免强光照射;
- ② 使用前上下颠倒轻轻混匀 Mix, 请勿涡旋振荡混匀, 避免产生过多气泡。

#### 3. 建议的 qPCR 反应体系

试剂	使用量	终浓度
Taq-HS Probe qPCR Premix	10 μl	1×
正向引物 (10 μM) <sup>a</sup>	0.4 μl	0.2 μM
反向引物 (10 μM) <sup>a</sup>	0.4 μl	0.2 μM
TaqMan 探针 (5 μM) <sup>b</sup>	1 μl	0.25 μM
DNA 模板 <sup>c</sup>	X μl	10~200 ng/20 μl
Nuclease-Free Water	To 20 μl	

a. 引物推荐终浓度为 0.2 μM, 效果不佳时可以在 0.1~1 μM 进行调整; 引物长度请设定 18~25 bp, GC 含量为 40%~60%。最佳效率的扩增目标片段一般为 80~200 bp, 设计时应尽量避免发夹结构、二聚体等复杂结构, 并尽可能横跨内含子区域;

b. 探针终浓度推荐为 0.25 μM, 效果不佳时可以在 0.1~1 μM 进行调整;

c. 模板添加量不应超过总反应体系的 10%, 推荐加样量为 1~2 μl。不同种类 DNA 模板中含有的靶基因拷贝数目不同, 必要时可进行梯度稀释, 以确定最佳的 DNA 模板添加量。

#### 4. qPCR 反应程序 (可根据机型适当调整)

##### 两步法

步骤	温度	时间
预变性	95°C	5 min
变性	95°C	10 sec
退火 & 延伸	60°C	30 sec

← 40 Cycles

##### 注意事项

1. 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。
2. 避免反复冻融 Mix, 开启后尽量在 3 个月内使用完毕。

## 常见问题

问题描述	可能原因	解决办法
扩增曲线混乱或缺失	仪器设置不正确	根据仪器说明书调整设置
	引物或模板浓度不当	调整引物和模板浓度
	PCR 反应条件不当	降低退火温度、延长延伸时间等。对于 GC 含量高的目标片段，可适当延长变性时间
	引物或模板存在高级结构	重新设计引物
	样品纯度不好	进一步纯化样品
定量值 重复性差	仪器设置不正确	根据仪器说明书调整设置
	样品纯度不好	进一步纯化样品
	引物浓度不当	尝试适当提高引物浓度
	PCR 反应条件不当	尝试降低退火温度、延长延伸时间等
	引物设计不当	重新设计引物，减少目标片段的高级结构
	实验操作误差	严格按照操作规程，保证反应体系中各组分体积精确
空白对照 出现信号	出现污染	首先更换空白对照的水；如果还发生同样情况，继续更换引物、枪头、PCR 管或启用新的 Mix