

Fast Probe Mixture

项目号: F665766

保存条件: -20℃, 如需频繁使用, 可存放于2-8℃, 尽量避免反复冻融。

产品内容

Component	F665766-5ml
2×Fast Probe Mixture	5×1ml
ddH ₂ O	5×1ml

产品简介

Fast Probe Mixture是专用于探针法(TaqMan, Molecular Beacon等)实时荧光定量PCR的预混体系, 浓度为2×, 包含Fast Taq DNA Polymerase、PCR Buffer、dNTPs、Mg²⁺等, 操作简单方便。主要用于基因组DNA靶序列和RNA反转录后的cDNA靶序列检测。本品含有的Fast Taq DNA Polymerase, 能有效减少在常温条件下由引物和模板非特异性结合或引物二聚体而产生的非特异性扩增, 酶的激活仅需在95℃孵育30s。整个PCR反应过程比普通反应可节省约40分钟, 大大缩短了PCR的反应时间。独特的PCR缓冲体系与快速热启动酶的组合, 有效抑制了非特异产物的产生, 并显著提高了PCR的扩增效率, 荧光信号更强, 灵敏度更高, 线性范围更宽。该产品适用范围广, 可用于普通和快速定量PCR程序。

ROX染料用于校正定量PCR仪孔与孔之间产生的荧光信号误差, 一般用于ABI、Stratagene等公司的Real Time PCR扩增仪。不同仪器的激发光学系统有所不同, 因此ROX染料的浓度必须与相应的荧光定量PCR仪相匹配。

不需要ROX校正的仪器:

Roche LightCycler 480, Roche LightCycler 96, Bio-rad iCycler iQ, iQ5, CFX96等。

需要Low ROX校正的仪器:

ABI Prism7500/7500 Fast, QuantStudio®3 System, QuantStudio®5 System, QuantStudio®6 Flex System, QuantStudio®7 Flex System, ViiA 7 system, Stratagene Mx3000/Mx3005P, Corbett Rotor Gene 3000等。

需要High ROX校正的仪器:

ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One/Step One Plus等。

注意事项

- 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。
- 避免反复冻融本品, 反复冻融可能使产品性能下降。本产品长期保存可置于-20℃, 避光。如果在短期内需要频繁使用, 可在2-8℃保存。

使用方法

以下举例为常规PCR反应体系和反应条件, 实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

1. PCR反应体系

试剂	50 μl 反应体系	终浓度
2×Fast Probe Mixture	25 μl	1×
Forward Primer, 10μM	1 μl	0.2 μM ¹⁾
Reverse Primer, 10μM	1 μl	0.2 μM ¹⁾
Probe, 10 μM	1 μl	0.2 μM ²⁾
Template DNA	2 μl ³⁾	
50×Low ROX or High ROX (optional) ⁴⁾	1 μl	1×
ddH ₂ O	up to 50 μl	

注意：1) 通常引物浓度以 $0.2 \mu\text{M}$ 可以得到较好结果，可以在 $0.1-1.0 \mu\text{M}$ 作为设定范围的参考。2) 所用探针的终浓度，与使用的荧光定量PCR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要求进行浓度的调节。3) 通常DNA模板的量以 $10-100\text{ng}$ 基因组DNA或 $1-10\text{ng}$ cDNA为参照，因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。4) 不同仪器的激发光学系统有所不同，根据使用荧光定量的仪器选择加入 $50\times\text{Low ROX}$ or $50\times\text{High ROX}$ 。

2. PCR反应程序：

建议采用两步法PCR反应程序，本程序是以ABI 7500荧光定量PCR仪为参照设定。

步骤	温度	时间
预变性	95°C	$30\text{s}^{1)}$
变性	95°C	5s
退火/延伸 ²⁾	60°C	30s

} 35-40个循环

注意：1) 本产品所采用的酶须在预变性 95°C 、 30s 条件下实现酶的活化。在此条件下，大多数模板可良好的进行解链。对GC含量高、二级结构复杂的模板，可将预变性时间延长至1-4分钟，以使起始模板充分解链。

2) 建议采用两步法PCR反应程序，若因使用 T_m 值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法PCR扩增，退火温度请以 $56^{\circ}\text{C}-64^{\circ}\text{C}$ 的范围作为设定参考。