

描述: 本制品是采用 TaqMan 探针法进行 Real-Time PCR 的专用试剂, 适合于 FAM/HEX/TET/JOE 等双标记探针 (本品也适用于 Molecular Beacon 探针), 其中 2xHi TaqMan qPCR Mix 将化学修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶、反应 Buffer、dNTP 染料等试剂预混在一起, 是一种 2x 浓度的单组分预混试剂, 进行实验时, PCR 反应液的配制十分方便简单, 只需加入引物、探针、模板、水即可。

制品中的 DNA 聚合酶为化学法修饰的 Hot Start Taq DNA 聚合酶, 该酶在 50℃ 以下 100% 无活性, 只有 95 度条件下加热 15min 后才能完全恢复酶的活力。因此该系统可以有效抑制非特异性 PCR 扩增, 极大的提高了 PCR 扩增特异性。该试剂盒独特的反应缓冲液, 可在宽范围中得到良好的扩增结果、检测灵敏度更高、信号更强。

该制品配有单独的 ROX 内参染料, 使得该试剂可应用于所有 RealTime PCR 机型, 包括: ABI 7000/7700/7900HT, 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems); Mx3000P (Stratagene); LightCycler (Roche Diagnostics); Opticon2、MyiQ 2、CFX96 Real-Time PCR(Bio-Rad&MJ); Line-Gene(Bioer, 杭州博日)等。

包装

规格	5xHi TaqMan qPCR Mix	50xROX Dye
100T (A2306A)	0.4 ml	200 µl
500T (A2306B)	1 mlx2	200 µl

储存:

(1) 长期保存, 请避光置于 -20℃ 或 -70℃ 可保存 3 年。

(2) 经常使用, 融化后可置于 4℃, 可保存 1 年。

注: 长期 -20℃ 保存可能会出现沉淀, 室温融化后混合均匀, 不影响试剂性能。

操作方法

1. 根据机型选择步骤 A 或 B

A: 需要添加 ROX 染料进行反应孔间信号矫正的 Real-Time PCR 仪, 包括: ABI PRISM7000/7700/7900HT, 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems); Mx3000P (Stratagene) 等。按照如下组分配制 20 µl PCR 反应体系:

	终浓度	
5xHi TaqMan qPCR Mix	4 µl	1x
50xROX Reference Dye	0.4 µl	1x
PCR Forward Primer(10 µM)	0.8 µl	0.4 µM
PCR Reverse Primer(10 µM)	0.8 µl	0.4 µM
TaqMan Probe (10 µM)	0.4 µl	0.2 µM
DNA 模板	0.5~2 µl	
ddH ₂ O	Up to 20 µl	

B: 无需添加 ROX 染料进行反应孔间信号矫正的 Real-Time PCR 仪, 包括: LightCycler (Roche Diagnostics); MiniOpticon、Opticon2、MyiQ 2、CFX96 Real-Time PCR(Bio-Rad & MJ); Line-Gene(Bioer, 杭州博日)等。按照如下组分配制 20 µl PCR 反应体系:

	终浓度	
5xHi TaqMan qPCR Mix	4 µl	1x
PCR Forward Primer(10 µM)	0.8 µl	0.4 µM
PCR Reverse Primer(10 µM)	0.8 µl	0.4 µM
TaqMan Probe (10 µM)	0.4 µl	0.2 µM
DNA 模板	0.5~2 µl	
ddH ₂ O	Up to 20 µl	

2. 进行 Real-Time PCR 反应, 通常采用两步法, 程序如下:

Stage 1: 95℃ 15min*

Stage 2: 95℃ 10s

60℃ 60s 35~45 cycles

注意: 由于该酶为化学修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶, 必须于 95℃ 加热 15min 才能恢复酶的活性, 该热启动步骤不能缩短或延长。

3. 反应结束后确认 Real-Time PCR 的扩增曲线和标准曲线。