

Lyo-Ready qPCR Master Mix

Code No. TCH002

包装量: 1 ml

制品说明:

Lyo-Ready qPCR Master Mix 是一款可冻干的探针法 Real Time PCR (qPCR) 的专用试剂。本制品预制成 4X 浓度, 其中含有 *Taq* HS、优化的反应 buffer、dNTP 及冻干保护剂等。本制品无需额外添加冻干保护剂及赋型剂, 既可以直接用于 cake (原位) 冻干, 也可用于 beads (微球) 冻干。本制品也可以添加引物、探针后进行冻干, 冻干后的产品可以室温保存和运输。

保存: -20°C

冻干流程:

将 Lyo-Ready qPCR Master Mix 充分融化, 颠倒混匀后使用, 避免反复冻融, 冻融次数不超过 5 次。

冻干前, Master mix 的浓度可以调整为 1X~2.5X, 且可以含有引物、探针, 具体冻干的条件需要根据实际情况进行优化。

- 总循环时间和干燥时间可以根据需求调整, 通常预计在 20~30 小时可以完成。
- 在环境温度下长期储存时, 请将冻干产品保存在避光的密封袋中, 并放入二氧化硅干燥剂, 且保证环境湿度相对较低。

Master mix 准备 (避光 tube 中配制)

灭菌水	up to 8~20 μl^{*1}
Lyo-Ready qPCR Master Mix(4X)	5 μl
Forward Primer(10 μM)	0.4 μl^{*2}
Reverse Primer(10 μM)	0.4 μl^{*2}
Probe(10 μM)	0.4 μl^{*3}

- *1 冻干总体积可以根据实际冻干条件及工艺进行优化, cake(原位)冻干浓度范围需要控制在 1X~2.5X, 即添加 5 μl Lyo-Ready Master Mix, 总冻干体积需控制在 8~20 μl ; beads(微球)冻干浓度 2X, 即添加 5 μl Lyo-Ready Master Mix, 总冻干体积 10 μl 。
- *2 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 0.1~1.0 μM 范围内调整引物浓度。
- *3 使用的探针浓度, 与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关, 试剂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。使用 Thermal Cycler Dice™ Real Time System 时, 通常探针终浓度在 0.1~0.5 μM 范围内进行调整。

Cake (原位) 冻干例 (具体冻干条件需根据冻干机、环境因素、溶液体积等进行优化)

1. 将上述 Master mix 轻轻混匀, 并离心, 按照设定的分注体积分装至放于 96-well rack 的 8-well strips 中, 若有气泡, 离心去除。
2. 上盖打开, 将 rack 放入冻干机。
3. -70°C 预冻 4 小时。
4. -30°C, 150 mTorr 的条件下干燥, 直到一次干燥完成 (≥ 10 小时)。
5. 20°C, 150 mTorr 以下的条件进行二次干燥 (≥ 10 小时)。
6. 冻干品包装, 环境湿度控制在 10% 以下。

Beads (微球) 冻干例 (具体冻干条件需根据冻干机、环境因素、溶液体积等进行优化)

1. 将上述 Master mix 轻轻混匀, 并离心, 按照设定的分注体积制备成 Beads (微球) (可使用液氮冷冻方式的滴珠机进行制备, 具体制备方式需配合仪器进行优化)。
2. 冻干机使用前, 请将隔板温度降至 -30°C 以下。
3. -70°C 预冻 4 小时。
4. -40°C, 150 mTorr 以下的条件下干燥, 直到一次干燥完成 (≥ 10 小时)。
5. 20°C, 150 mTorr 以下的条件进行二次干燥 (≥ 10 小时)。
6. 冻干品包装, 环境湿度控制在 10% 以下。

PCR 反应液配制:

Reaction 准备 (冻干品中不含有引物、探针)	
灭菌水	up to 20 μl
Lyophilized master mix	1 cake/ bead
Forward Primer (10 μM)	0.4 μl^{*1}
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl^{*1}
Probe (10 μM)	0.4 μl^{*2}
Template	2 μl^{*3}
Total	20 μl

- *1 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 0.1~1.0 μM 范围内调整引物浓度。
- *2 使用的探针浓度, 与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关, 试剂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。使用 Thermal Cycler Dice Real Time System 时, 通常探针终浓度在 0.1~0.5 μM 范围内进行调整。

Reaction 准备 (冻干品中含有引物、探针)

灭菌水	up to 20 μl
Lyophilized master mix(w/Primers/Probes)	1 cake/ bead
Template	2 μl^{*3}
Total	20 μl

- *3 模板添加量因模板溶液中存在的靶基因的拷贝数不同而不同, 进行梯度稀释研讨适当的模板添加量。模板 DNA 添加量最好在 100 ng 以下。以 RT-PCR 反应的 cDNA (RT 反应液) 为模板时, 添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

使用移液器缓慢吸打, 或轻轻振荡混匀, 使冻干品的 Master mix 完全溶解后, 轻轻离心将溶液收集至管底。冰上静置 5 分钟后, 轻轻振荡混匀, 再度轻轻离心将溶液收集至管底。

PCR 反应条件:

(25°C 10 min) ^{*1}	} 40 cycles
95°C 30 sec	
95°C 5 sec	
60°C 30 sec ^{*2}	
(*信号采集)	

- *1 如果担心先前 PCR 产物造成污染, 在预变性条件之前增加 25°C 10 分钟的 UNG 处理步骤, 通过 UNG 的作用, 降解先前反应产生的 PCR 产物。
- *2 仪器不同, 检出步骤有不能设置在 30 秒的情况。此时, 请按照该仪器能设定的秒数设置 (31 秒, 34 秒等)。

实验结果分析

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线, 进行 PCR 定量时制作标准曲线等。分析方法参见使用仪器的操作手册。

Thermal Cycler Dice is a trademark of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。
未经 Takara Bio Inc. 书面许可授权或批准, 不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品, 或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。
如果您需要其他用途的许可授权, 请联系我们, 或访问我们网站 www.takarabio.com。
您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。
所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术 (北京) 有限公司翻译制作, 最新版本文件请参考 Takara Bio Inc. 网站。为正确使用 Takara 产品, 您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

v202406Da