

## 5X GDSIyo Multiplex Probe qPCR Mix Plus U

### 货号规格

货号	P2721
50- $\mu$ l 反应数	1,000 rxns

### 产品简介

5X GDSIyo Multiplex Probe qPCR Mix Plus U 是可冻干的 5X 多重探针 qPCR Master Mix。本品含有抗体技术修饰的热启动酶 Hotstart Taq DNA 聚合酶，配合东盛特制的 Real Time PCR Buffer，不仅有效抑制引物二聚体和其他非特异性扩增，而且能够提高扩增效率。该试剂引入了 dUTP/UDG 防污染系统，可以在 PCR 反应前清除含 dUTP 的 PCR 产物，有效避免因扩增产物的交叉污染对定量影响。本品方便用于搭配 TaqMan、引物实现全预混 Master Mix 分子诊断试剂盒，与常见定量 PCR 仪完美兼容，如 ABI、Roche、Bio-Rad 等。本产品冻干后形态良好，具有优秀的扩增性能及稳定性。

### 产品组成

Component	P2721
5X GDSIyo Multiplex Probe qPCR Mix Plus U ( $Mg^{2+}$ Free) <sup>a</sup>	10 ml
250mM $MgCl_2$	1 ml
4X Lyoprotectant	12.5 ml

a. 包含 Hotstart Taq DNA 聚合酶，dNTP/dUTP Mix，UDG (Uracil-DNA Glycosylase) 及反应缓冲液等。

### 保存条件

-20°C 可长期保存，4°C 可保存 3 个月。避免反复冻融。

### 质量控制

纯度检测：经质量检测，产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测：经不同来源的模板和引物检测，产品具有优秀的特异性、灵敏性及可重复性等。

### A. qPCR 应用举例

### 1. 配制反应体系

请于冰上配制以下反应体系：

Component	25- $\mu$ l rxn	50- $\mu$ l rxn	Final Conc.
5X GDSIyo Multiplex Probe qPCR Mix Plus U ( $Mg^{2+}$ Free)	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	1X
250mM $MgCl_2$	0.45 $\mu$ l	0.9 $\mu$ l	4.5 mM
4X Lyoprotectant <sup>[1]</sup>	6.25 $\mu$ l	12.5 $\mu$ l	1X
Forward primer (10 $\mu$ M) <sup>[2]</sup>	0.5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
Reverse primer (10 $\mu$ M) <sup>[2]</sup>	0.5 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
Probe (10 $\mu$ M) <sup>[2]</sup>	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M
DNA template <sup>[3]</sup>	X $\mu$ l	Y $\mu$ l	-
ddH <sub>2</sub> O	To 25 $\mu$ l	To 50 $\mu$ l	-

[1] 此体系为可冻干体系，在液体试剂阶段进行产品性能验证时，必需加入 4X 冻干保护剂，以保证与冻干后体系组分及效果一致。当使用此体系无冻干需求时，4X 冻干保护剂可以选择性加入。

[2] 引物终浓度建议范围：0.1-1.0  $\mu$ M，通常引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 效果较好。使用探针的浓度与 Real Time PCR 扩增仪、探针种类和荧光标记物种类有关，使用时请参照相关说明。通常探针终浓度在 0.1-0.5  $\mu$ M 之间。

[3] DNA 模板建议用量 (25  $\mu$ l 体系)：1-10 ng cDNA，或 10-100 ng gDNA。加样体积不宜过小，以免造成较大的误差，但未稀释的 cDNA 不宜超过总体积的 1/10。

[4] 建议总体积不小于 10  $\mu$ l，以免造成较大的加样误差。具体体积范围参考仪器说明。

注意：对于某些固定型号的仪器，需要添加 ROX 参比染料才能精确测定 Ct 值。由于 ROX 的使用体积较小，建议将 ROX 提前与 qPCR Mix 混匀使用。ROX 用量参照具体仪器说明，下表仅供参考。

Instruments	Final Conc.
ABI PRISM 7000/ PRISM 7700/ 7300/ 7900HT/ Step One/ Step One Plus/ GeneAmp 5700	500nM (High ROX)
ABI 7500/ 7500 Fast/ ViiA 7/ QuantStudio 6/7/12K Flex; Agilent Stratagene Mx3000P/ Mx3005P/ Mx4000	50nM (Low ROX)
Bio-Rad CFX96/ CFX384/ iQ/ iQ5; MJ Research Opticon 2/ Chromo 4; Roche LightCycler 480/ 96; Corbett Rotor Gene G/ Q/ 3000/ 6000; Thermo PikoReal 96; Eppendorf MasterCycler ep realplex; Cepheid Smart Cycler	No ROX

## 2. 设定反应程序进行 qPCR 反应

两步法程序示例如下：

Stage	Temperature	Time	Cycle
UDG pre-treatment	50°C	2 min	1
Initial denaturation	95°C	1-5 min	1
Denaturation	95°C	10-20 sec	40
Annealing & Extension <sup>[1]</sup>	60°C	20-60 sec	

[1] 仪器在此阶段进行信号采集，请根据仪器类型设置反应时间。若反应效果不佳，建议采用三步法扩增程序。

经典三步法程序示例如下：

Stage	Temperature	Time	Cycle
UDG pre-treatment	50°C	2 min	1
Initial denaturation	95°C	1-5 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	40
Annealing <sup>[1]</sup>	60°C	15 sec	
Extension	72°C	20 sec	

[1] 仪器在此阶段进行信号采集，请根据仪器类型设置反应时间。常用退火温度在 55-65°C 之间。退火温度一般设定为所用引物的  $T_m-5^\circ\text{C}$ ，若低于 55°C，则以  $T_m$  值为退火温度，一般不低于 55°C。请根据仪器类型设置反应时间。

## 3. 分析结果

观察扩增曲线；调整基线，计算 Ct 值；进行相对或绝对定量。

### B. 冻干应用举例

#### 1. 配制反应体系

请于冰上配制以下反应体系：

Component	25- $\mu\text{l}$ rxn	Final Conc.
5X GDSIyo Multiplex Probe qPCR Mix Plus U (Mg <sup>2+</sup> Free)	5 $\mu\text{l}$	1X
250mM MgCl <sub>2</sub>	0.45 $\mu\text{l}$	4.5 mM
4X Lyoprotectant	6.25 $\mu\text{l}$	1X
25X Primer-Probe Mix	1 $\mu\text{l}$	-
ddH <sub>2</sub> O	To 18-20 $\mu\text{l}$	-

## 2. 设定冻干条件进行冻干反应

Stage	Temperature	Time	State	Pressure
Pre-freezing	4°C	30 min	Hold	1 atm
	-50°C	60 min	Cooling	
	-50°C	180 min	Hold	
1st sublimation	-30°C	60 min	Heating	ultimate vacuum
	-30°C	720 min	Hold	
2nd sublimation	25°C	60 min	Heating	ultimate vacuum
	25°C	300 min	Hold	

1. 此冻干工艺为 25  $\mu\text{l}$  体系原位冻干工艺，如需进行冻干珠的冻干或其他体系原位冻干，请另询。

2. 以上冻干工艺仅作参考。产品类型不同、使用不同的冻干机，冻干参数有差异，使用过程中可根据实际对工艺进行调整。

3. 不同的冻干工艺有可能适用于不同的冻干批量，用于大批量生产时务必进行充分的测试验证。

### 3. 冻干粉使用方法

1. 将冻干粉进行瞬时离心；

2. 向冻干粉中加入核酸模板，并加水补足至 25  $\mu\text{l}$ ；

3. 混匀离心，上机。

本品仅供科学研究使用。