



GoldStar Probe Mixture (UNG)

目录号：CW2563M CW2630M CW2631M (5 ml)

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	CW2563M	CW2630M	CW2631M
	5 ml	5 ml	5 ml
2×GoldStar Probe Mixture (UNG)	5×1 ml	5×1 ml	5×1 ml
50×Low ROX	-	200 μl	-
50×High ROX	-	-	200 μl
ddH ₂ O	5×1 ml	5×1 ml	5×1 ml

产品简介

2×GoldStar Probe Mixture (UNG) 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GoldStar Taq DNA polymerase、PCR Buffer、dNTPs (dTTP全部被dUTP所取代)、UNG酶和Mg²⁺, 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靶序列的检测, 如基因表达分析, 拷贝数分析, SNP基因型分析等。本产品中运用了dUTP-UNG防污染系统, 在PCR反应体系配制过程中加入了dUTP, 因此就形成了含有dU碱基的扩增产物。而此产物可以在下次进行PCR反应前, 由PCR体系中的UNG酶处理消除。这样就有效的去除了PCR产物的残留污染, 大大降低了由于扩增产物污染而导致的假阳性。UNG酶在PCR循环中的预变性步骤即可被灭活, 因此不会影响新的含dU碱基PCR产物的形成。本品含有的GoldStar Taq DNA Polymerase是一种经化学修饰的、全新高效热启动酶, 在常温下没有聚合酶活性, 有效避免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, 酶的激活须在95℃下孵育10分钟。独特的PCR缓冲体系与热启动酶的组合, 显著提高了PCR的扩增效率, 荧光信号更强, 灵敏度更高, 可以检测单拷贝的模板。使用本产品可以得到更广的线性范围, 对目的基因定量更准确。

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 (CW2563) :

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

需要Low ROX校正的仪器 (CW2630) :

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 (CW2631) :

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

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 μ l反应体系	终浓度
2 \times GoldStar Probe Mixture (UNG)	25 μ l	1 \times
Forward Primer, 10 μ M	1 μ l	0.2 μ M ¹⁾
Reverse Primer, 10 μ M	1 μ l	0.2 μ M ¹⁾
Probe, 10 μ M	1 μ l	0.2 μ M ²⁾
Template DNA ³⁾	2 μ l ³⁾	
50 \times Low ROX or High ROX (optional) ⁴⁾	1 μ l	1 \times
ddH ₂ O	up to 50 μ l	

注意：1) 通常引物浓度以0.2 μ M可以得到较好结果，可以在0.1-1.0 μ M作为设定范围的参考。

2) 使用的探针浓度，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 ng基因组DNA或1-10 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 Low ROX or 50 \times High ROX。

2. PCR反应程序

注意！本产品预变性反应必须在95 $^{\circ}$ C 10分钟下完成！

两步法PCR:

步骤	温度	时间	
UNG酶 消化	37 $^{\circ}$ C/50 $^{\circ}$ C	2-10 min	
预变性	95 $^{\circ}$ C	10 min ¹⁾	} 35-40 个循环
变性	95 $^{\circ}$ C	15 s	
退火/延伸 ²⁾	60 $^{\circ}$ C	1 min	

注意：1) 本产品所采用的热启动酶须在预变性95 $^{\circ}$ C、10 min条件下实现酶的活化。

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。

三步法PCR:

步骤	温度	时间	
UNG酶 消化	37°C/50°C	2-10 min	
预变性	95°C	10 min	
变性	95°C	15 s	} 35-40 个循环
退火	55°C-65°C	30 s	
延伸	72°C	30 s	

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途