



Animal Detection Lyo Probe Mixture (UNG)(Mg²⁺ free)

目录号：CW3222S (1 mL)

CW3222M (5 mL)

保存条件：-20±5°C，短期使用可存放于2-8°C，尽量避免反复冻融。

产品内容

Component	CW3222S 1 mL	CW3222M 5 mL
2×Animal Detection Lyo Probe Mixture (UNG) (Mg ²⁺ free)	1 mL	5 mL
AD 冻干保护剂	500 μL	2.5 mL

产品简介

2×Animal Detection Lyo Probe Mixture (UNG) (Mg²⁺ free)是一款适用于探针法检测DNA病毒的不含有Mg²⁺的专用可冻干预混液，浓度为2×，包含新型抗体修饰的Taq DNA聚合酶、PCR Buffer、dNTPs、以及增强剂和稳定剂，使用方便快捷。本品不含有Mg²⁺，可自行调整Mg²⁺含量适应不同扩增需求。该产品可以兼容单重与多重探针法qPCR反应体系，同时也可用于冻干检测试剂的制备。

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。

使用前准备及注意事项

1. 使用前请在本品完全融化后上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
2. AD冻干保护剂可置于70°C水浴中融化备用。
3. 本产品长期保存可置于-20°C，如果在短期内需要频繁使用，可在2-8°C保存。
4. ROX染料用于校正定量PCR孔间产生的荧光信号误差，本品中不含ROX染料，如所使用仪器需匹配ROX染料,请联系当地业务或致电康为世纪客服，电话4006-222-360。

使用方法

1. PCR反应体系

试剂	50 μ L体系	25 μ L体系	终浓度
2×Animal Detection Lyo Probe Mixture (UNG)	25 μ L	12.5 μ L	1×
AD 冻干保护剂	12.5 μ L	6.25 μ L	
Mg ²⁺	As required	As required	
Forward Primer, 10 μ M	1 μ L	0.5 μ L	0.2 μ M ¹⁾
Reverse Primer, 10 μ M	1 μ L	0.5 μ L	0.2 μ M
Probe ²⁾	1 μ L	0.5 μ L	0.2 μ M
Template DNA ³⁾	X μ L	X μ L	
50×ROX reference dye (optional) ⁴⁾	1 μ L	0.5 μ L	1×
ddH ₂ O	Up to 50 μ L	Up to 25 μ L	

注意：

- 1) 通常引物终浓度以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。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。
- 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 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× Low ROX or 50×High ROX。不同机型ROX reference dye使用情况参考下表。

无需添加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。

2. PCR反应程序

步骤	温度	时间	循环
UNG消化	50°C	2 min	1
预变性	95°C	30 s ¹⁾	1
变性	95°C	10 s	} 45
退火/延伸	60°C	20 s ²⁾	

注意：

1) 本产品所采用的酶在预变性95°C、30 s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1min，以使起始模板充分解链，若高温处理时间过长，会对酶的活性造成影响；对于简单模板也可采用预变性20 s，可根据模板情况确定最佳的预变性时间。

2) 建议采用两步法PCR反应程序，退火温度请以58-64°C作为设定范围的参考，发生非特异性反应时，可提高退火温度。若因使用Tm值较低的引物或者扩增产物过长等原因，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°C-64°C的范围作为设定参考。

几种常见仪器的退火延伸时间设定如下：

使用Roche，BioRad、Agilent和宏石、东胜等公司荧光定量PCR仪时请设定在20 s。

使用ABI 7000/7300/7500时请设定在30 s。

退火、延伸时间可根据使用不同型号仪器和不同模板进行设定，请按照仪器使用说明书要求进行实验操作。

3. 冻干程序

阶段	步骤	温度	斜率时间	控温时间	真空度Pa	备注
预冷	1	0°C		30 min	--	
预冻	2	-50°C	--	3 h	--	常温最快速率降温
	3	-30°C	--	3 h	14	可设置斜率
升华干燥	4	-10°C	--	2 h	14	时间, 做斜率
	5	0°C	--	1 h	14	控制升温
解析干燥	6	30°C	--	4 h	14	

注意：

1) 辅料配方发生微量的变化, 需重新测定冻干参数, 并做相应调整。

2) 冻干设备要求：

冷阱盘管表面温度 $\leq -50^{\circ}\text{C}$

板层温度 $\leq -45^{\circ}\text{C}$, 温度均一性 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ (性能详细说明及验证方案咨询康为技术人员)

可做压升测试 (冻干生产前, 做泄漏率测试)

3) 环境要求：溶液分装及配置尽量在万级层流保护下进行, 环境空间尘埃掉落进溶液中成为冻干过程的晶核, 影响溶液的结晶的过冷度, 导致产品质量不一致性。