



TIANtough基因分型PCR试剂

(Probe) (FP211)

操作指南

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170424

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. DNA 样本
2. 移液器及配套枪头 (RNase-free)
3. 1.5 ml 离心管 (RNase-free) , 200 μ l PCR管 (RNase-free)
4. 涡旋振荡器, 台式离心机, 金属浴/ PCR仪



Step 1



融解2× TIANtough Genotyping PreMix, 50× ROX Reference Dye, DNA模板, 引物, 探针和 RNase-Free ddH₂O, 并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀, 之后置于冰上。

使用前将每种溶液涡旋振荡混匀, 简短离心以收集残留在管壁的液体。

Step 2

建议在冰上按下表进行Real Time PCR反应液的配制

组成成分	20 μ l 体系	终浓度
2 \times TIANtough Genotyping PreMix	10 μ l	1 \times
正向引物(10 μ M)	0.6 μ l	0.1-0.9 μ M
反向引物(10 μ M)	0.6 μ l	0.1-0.9 μ M
荧光探针(10 μ M)	0.4 μ l	0.1-0.25 μ M
DNA模板	2 μ l	—
50 \times ROX Reference Dye	—	—
RNase-free ddH ₂ O	至20 μ l	—



Tips

1. 配制定量混合液时，应首先确定所需的反应数量，然后在反应数量的基础上增加10%-20%，计算体系配制数量。例如，一共需要做5个定量反应时，则体系配制数量至少为6；一共需要做10个定量反应时，则体系配制数量至少为11；一共需要做20个定量反应时，体系配制数量至少为22。以此类推。
2. 按配制数量，先计算各个组分所需的用量，在冰上将所有组分共同配制到同一管中制成混合物，彻底混匀，短暂离心。

试剂	1个20 μ l体系 使用量	6个20 μ l体系 使用量	11个20 μ l体系 使用量	22个20 μ l体系 使用量
2 \times TIANtough Genotyping PreMix	10 μ l	60 μ l	110 μ l	220 μ l
正向引物(10 μ M)	0.6 μ l	3.6 μ l	6.6 μ l	13.2 μ l
反向引物(10 μ M)	0.6 μ l	3.6 μ l	6.6 μ l	13.2 μ l
荧光探针(10 μ M)	0.4 μ l	2.4 μ l	4.4 μ l	8.8 μ l
50 \times ROX Reference Dye	根据实际情况计算加入			
RNase-free ddH ₂ O	根据实际情况计算加入			

3. 将混合物分装至每个检测管/孔中，分别加入DNA模板，彻底混匀。

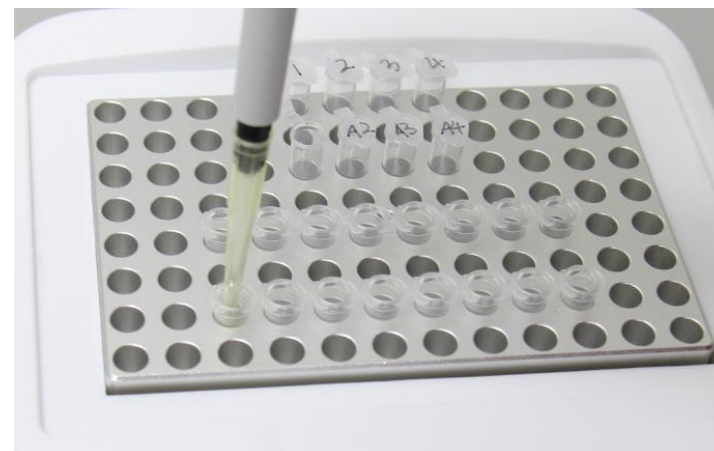
Tips

使用预混Mix再分装的方法可以有效提高实验的重复性。配制和分装时请在冰上操作。

引物终浓度为0.3 μM 可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时，可增加PCR反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少PCR反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的，可以在0.1-0.9 μM 范围内调整。

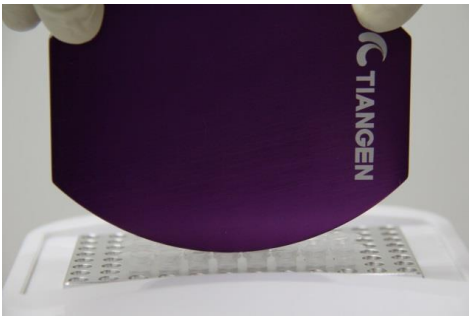
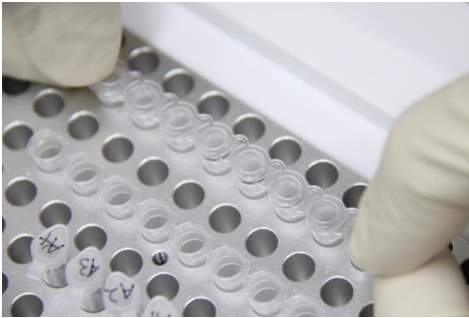
探针的浓度与使用的Real-Time PCR扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用说明进行。通常探针终浓度为0.2 μM 可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。需要进一步优化探针浓度的，可以在0.1-0.25 μM 范围内调整。

几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表：



仪器	终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/StepOne等	5 \times （例如：2.5 μl ROX/50 μl 体系）
ABI 7500、7500 Fast、ViiA 7； Stratagene Mx3000P、Mx3005P和Mx4000等	1 \times （例如：0.5 μl ROX/50 μl 体系）
Roche仪器，Bio-Rad仪器，Eppendorf仪器等	无需添加

Step 3



使用八连排管时，体系配制分装完毕后，改好管盖，用压盖器压实。在管盖两端做好标记，不要标记在检测孔正上方的管盖上，以免影响荧光读数。

使用96孔板时，体系配制分装完毕后，使用封口膜封板，压实，在孔板四周或未加样的检测孔出标记。

Step 4



使用微孔板离心机短暂离心96孔板或八连排管。注意管底朝向外侧，注意配平。
离心八连排管时，将八连排管置于管架上，用固定片固定后进行离心。

Step 5



阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C	2 min	预变性	否
PCR反应	40×	95°C	15 sec	变性	否
		60-66°C	30 sec	退火/延伸	是

将样本转移至荧光定量PCR仪，编好程序，开始qPCR反应。