QuickEasy™ Real Time PCR Kit-Taqman

For qPCR using cDNA, purified DNA

For research use only

Store at -20℃

Product introduction

The 2×QuickEasy™ Real PCR Mix-Taqman provided by QuickEasy™ Real Time PCR Kit-Taqman Kit is a new-generation premix system designed for the Real Time PCR amplification reaction using a specific fluorescent probe, and its core Foregene HS Taq DNA Polymerase is based on antibody modification and used with Foregene further-optimized PCR system. It has higher specificity and amplification efficiency, and has stronger amplification ability and low mismatch rate than ordinary PCR mix. Used in fluorescent quantification PCR reactions to reduce non-specific amplification and improve the accuracy of PCR. It can greatly improve the specificity of products and the sensitivity of reactions. At the same time, ROX is provided as an internal reference dye.

The QuickEasy™ Real Time PCR Kit-Taqman has a wide range of applications for template quantities, and can obtain good standard curves in different quantitative regions, accurately quantifying and detecting target genes, with good repeatability and high degree of confidence.

Product features

- Unique PCR optimization system makes the 2×QuickEasy™ Real PCR Mix-Taqman more compatible.
- Hot-start Foregene HS Taq Polymerase with higher amplification efficiency, higher amplification sensitivity, and higher amplification specificity.
- 2×QuickEasy™ Real PCR Mix -Taqman uses a unique system optimized by Foregene to improve the sensitivity and specificity of sequence-specific probe detection, which can be used for genotyping and copy number variant assays and obtaining accurate results.
- This product comes with ROX internal reference dye, which can be used to eliminate signal background and inter-well signal error, which is convenient for customers to use for different types of quantitative thermal cyclers.

©Copyright Foregene 2014/03. All rights reserved.

Kit application

Fluorescence quantitative PCR for template quantification;

Conventional PCR amplification;

Can be used for allele detection.

Product quality control

According to the FOREGENE's Total Quality Management System, each batch of QuickEasy™ Real Time PCR Kit-Taqman rigorously conducts multiple tests to ensure the reliability and stability of the quality of each batch of kits.

Kit contents

QuickEasy™ Real Time PCR Kit-Taqman (20μl system)				
Kit component	QP-01121	QP-01122	QP-01123	QP-01124
	200 Preps	500 Preps	1000 Preps	2000 Preps
2× QuickEasy™ Real PCR Mix-Taqman	1 mL × 2	1.7 mL × 3	1.7 mL × 6	1.7 mL × 12
20× ROX Reference Dye	200 μL	0.5 mL	1 mL	1 mL × 2
DNase-Free ddH_2O	1.7 mL	1.7 mL × 2	10 mL	20 mL
Manuals	1 piece	1piece	1piece	1piece

储存条件

1. 输运条件

全程低温冰盒运输，保证试剂盒处于 < 4℃状态。

2. 保存条件

本试剂盒避光保存于-20℃；若频繁使用，也可置于 4℃短期保存(限 10 天内用完)。

©Copyright Foregene 2014/03. All rights reserved.

试剂盒组分信息

- 2× QuickEasy™ Real PCR Mix-Taqman：包含福际生物特别改造的热启动 Taq DNA Polymerase、$MgCl_2$、优化配比的 dNTPs、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂等。PCR 反应时，只需将适当的裂解混合液、引物、DNase-ddH_20 添加到 2× QuickEasy™ Real PCR Mix-Taqman 中即可用于 PCR 反应。
- ROX Reference Dye：一般用于 ABI、Stratagene 等公司的 Real Time PCR 扩增仪上，用于调整 PCR 加样误差所引起的 PCR 管与管之间的差异。不同仪器所需 ROX Reference Dye 浓度不同，用户可以根据仪器的推荐浓度添加。
- DNase-Free ddH_2O：超纯水，用于 PCR 反应。

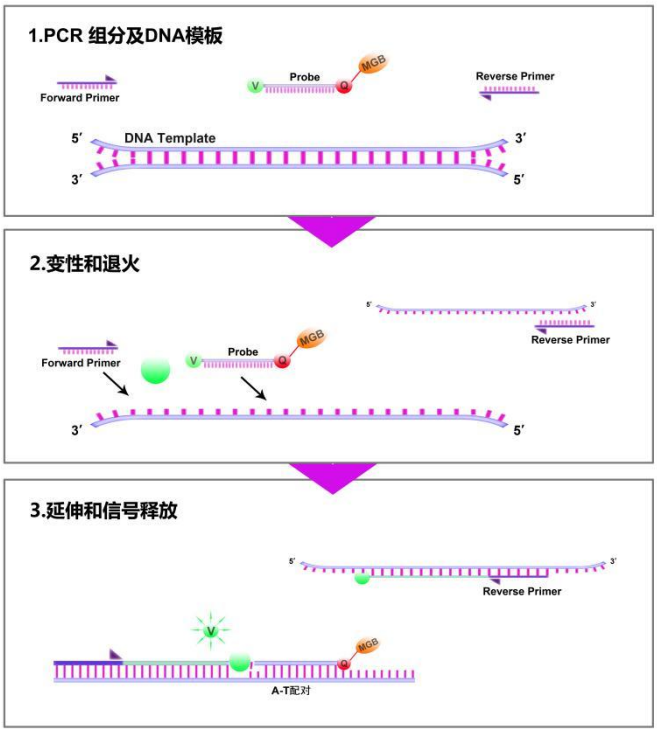
注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- 2× QuickEasy™ Real PCR Mix-Taqman 置于-20℃ 保存，应避免反复冻融，否则会影响 PCR 效率。
- 使用时请将 2× QuickEasy™ Real PCR Mix-Taqman 上下颠倒轻柔混匀，避免起泡，并瞬时离心后使用。如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。切勿使用振荡器混匀。
- 反应液的配制、分装请一定使用新的(无污染的)枪头、PCR 管等，尽量避免污染。

试剂盒原理

PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针，该探针为一寡核苷酸，两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收；PCR 扩增时，Taq 酶的 5'－3'外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条 DNA 链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。再通过实时监测整个 PCR 进程荧光信号的积累，与标准曲线对比进行定量分析。

©Copyright Foregene 2014/03. All rights reserved.



操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。

QuickEasy™ Real Time PCR Kit–Taqman 操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

实验材料和设备

- ◆ 0.2 mL 无菌 PCR 管。
- ◆ 荧光定量 PCR 扩增仪、微量移液器、冰浴。
- ◆ 自备 DNA 模板、PCR 引物、Probe。

安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。

©Copyright Foregene 2014/03. All rights reserved.

操作指南

A：Real Time PCR 体系配制

1. 取出 2× QuickEasy™ Real PCR Mix-Taqman、20× ROX Reference Dye、引物、Probe 等置于冰盒中，使其自然融化。融化后，上下颠倒混匀试剂，可用离心机瞬时离心收集散落在管壁和盖子上的液体。

   注意：2× QuickEasy™ Real PCR Mix-Taqman 放在室温或握在手中时间较长会变浑浊，可将其置于冰上 2-5min，待溶液澄清，上下颠倒混匀 3-5 次后再使用。

2. 将适量的 DNA 模板、引物、Probe 或 20× ROX Reference Dye 添加到 2× QuickEasy™ Real PCR Mix-Taqman 中，并用 DNase-Free ddH_2O 使其稀释为 1×(PCR 体系配制见下表 1)。

   注意：该操作应在冰浴上进行，长时间的室温放置会降低产品性能。

表 1：PCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	用　　量	终 浓 度
2× QuickEasy™ Real PCR Mix-Taqman	10 μL	1×
Forward Primer(10 μM)	0.8 μL	50-900 nM [1*]
Reverse Primer(10 μM)	0.8 μL	50-900 nM [1*]
Probe(4 μM)	1 μL	200 nM
Template	X μL	[2*]
20× ROX Reference Dye	-	[3*]
DNase-Free ddH_2O	(7.4-X) μL	
Total Volume	20 μL	

1*：通常引物终浓度为 400 nM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 50-900 nM 范围内调整引物浓度。

2*：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，进行梯度稀释探索适当的模板添加量。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%。

注意: qPCR体系可以根据实验需要和PCR型号进行调节。大多数特异引物的终浓度，我们推荐400 nM，Probe的终浓度我们推荐200 nM。特异引物和Probe的用量请根据配制的浓度按照我们推荐的终浓度自行调整用量。50 μL体系的qPCR，请参照20 μL体系按比例调整试剂用量。

3*：根据定量 PCR 仪器不同选择合适终浓度的 ROX Reference Dye。常见定量 PCR 仪的最适 ROX Reference Dye 浓度见下表：

©Copyright Foregene 2014/03. All rights reserved.

荧光定量 PCR 仪	ROX Reference Dye 终浓度
ABI PRISM7000/7300/7700/7900HT/Step One 等	1× (如 20 μL 体系，加入 1 μL 20×ROX Reference Dye)
ABI 7500/7500 Fast 和 Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000 等	0.5× (如 20 μL 体系，加入 0.5 μL 20×ROX Reference Dye)

B：Real Time PCR 反应

根据 A 步骤配制好 PCR 体系，混匀，根据优化好的 PCR 条件(退火温度等)进行 PCR 反应(反应条件见下表 2)。

表 2：Taqman 法 Real Time PCR 反应条件

步 骤	温 度	时 间	循环数	内 容
1	94℃	3min	1	预变性
2(两步)	94℃	5-10sec	40	循环中模板变性
	60-65℃	20-30sec		退火/延伸

注意：为了得到最佳的 PCR 效果，针对不同的模板、不同的引物可采用梯度 PCR 优化反应条件。PCR 反应条件视定量 PCR 仪、模板、引物等的不同而各异。在具体操作中需要根据定量 PCR 仪、模板类型、目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，反应时间等。

©Copyright Foregene 2014/03. All rights reserved.

问题分析指南

以下针对荧光定量 PCR 系列试剂盒在实验中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-83360257 或 E-mali：Tech@foregene.com。

无扩增信号

1. 试剂盒中的热启动Taq DNA Polymerase因试剂盒保存不当或过期而失去活性。

   建议：确认试剂盒的保存条件；重新在PCR体系中添加适量热启动Taq DNA Polymerase或者购买新的Real Time PCR Kit试剂盒进行相关实验。

2. DNA模板中存在大量的Taq DNA Polymerase的抑制因子。

   建议：重新纯化模板或降低模板的使用量。

3. Mg^{2+}浓度不适合。

   建议：我们提供的2× QuickEasy™ Real Time PCR Mix的Mg^{2+}浓度为3.5 mM。但针对有些特殊的引物和模板可能需要的Mg^{2+}浓度较高，因此可直接添加$MgCl_2$进行Mg^{2+}浓度的优化，建议每次增加0.5mM的Mg^{2+}进行优化。

4. PCR扩增条件不适合、引物序列或者浓度不当。

   建议：确认引物序列的正确性以及引物没有降解；扩增信号不好时，可尝试降低退火温度，适当调整引物浓度等。

5. 模板用量问题，太少或过多。

   建议：可进行模板线性化梯度稀释，选择PCR效果最好的模板浓度进行Real Time PCR实验。

NTC 出现过高的荧光值

1. 在操作过程中导致的试剂污染。

   建议：更换新的试剂进行Real Time PCR实验。

2. PCR反应体系配制时发生污染。

   建议：操作时进行必要的防护措施，比如：戴乳胶手套，使用带滤芯的枪头等。

3. 引物出现降解，引物降解会导致非特异性扩增出现。

   建议：可使用SDS-PAGE电泳检测引物是否降解，更换新的引物进行Real Time PCR实验。

©Copyright Foregene 2014/03. All rights reserved.

出现引物二聚体或非特异性扩增

1. Mg^{2+}浓度不适合。

   建议：我们提供的2× QuickEasy™ Real Time PCR Mix的Mg^{2+}浓度为3.5 mM。但针对有些特殊的引物和模板可能需要的Mg^{2+}浓度较高，因此可直接添加$MgCl_2$进行Mg^{2+}浓度的优化，建议每次增加0.5mM的Mg^{2+}进行优化。

2. PCR退火温度过低。

   建议：每次增加1℃或者2℃进行PCR退火温度的优化。

3. PCR产物太长。

   建议：Real Time PCR产物长度最好在100-150bp之间，不要超过500bp。

4. 引物出现降解，引物降解会导致很会飞特异性扩增出现。

   建议：可使用SDS-PAGE电泳检测引物是否降解，更换新的引物进行Real Time PCR实验。

5. PCR体系不当，或体系太小。

   建议：PCR反应体系太小会导致检测精度降低。最好使用定量PCR仪推荐的反应体系重新进行Real Time PCR实验。

定量值重复性差

1. 仪器故障。

   建议：仪器的每一个PCR孔之间可能存在误差，在温度管理或检测时产生重现性较差现象。请根据相应仪器的说明书进行点检。

2. 样品纯度不好。

   建议：样品不纯会导致实验的重复性较差，这包括模板、引物的纯度。最好进行模板的再纯化，引物最好使用SDS-PAGE纯化。

3. PCR体系配制放置时间过长。

   建议：Real Time PCR体系配制好后立即用于PCR实验，不要搁置太长时间。

4. PCR扩增条件不适合、引物序列或者浓度不当。

   建议：确认引物序列的正确性以及引物没有降解；扩增信号不好时，可尝试降低退火温度，适当调整引物浓度等。

5. PCR体系不当，或体系太小。

   建议：PCR反应体系太小会导致检测精度降低。最好使用定量PCR仪推荐的反应体系重新进行Real Time PCR实验。

©Copyright Foregene 2014/03. All rights reserved.

中国 • 福际 World's Foregene

成 都 福 际 生 物 技 术 有 限 公 司
电话：028-83360257，028-83361257
E-mail：info@foregene.com
Http://www.foregene.com