



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
 订货热线: 400-1683301或800-8283301  
 订货e-mail: order@beyotime.com  
 技术咨询: info@beyotime.com  
 网址: http://www.beyotime.com

## BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)

产品编号	产品名称	包装
D7523S	BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)	100次
D7523M	BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)	500次
D7523L	BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)	2500次

### 产品简介:

- 碧云天的BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, 防污染型), 即BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, UDG), 是一种基于TaqMan等探针的用于多重实时荧光定量PCR, 即多重探针法qPCR (Quantitative PCR)或real-time PCR的新型高品质防污染(Carryover prevention)预混液, 主要用于cDNA和基因组DNA等的特异性超高灵敏度定量检测。本产品含有优化比例的高品质UDG酶和dUTP, 可有效消除PCR扩增过程中带来的产物污染问题造成的假阳性或CT值偏低。由于使用的探针一般是TaqMan探针, 所以本方法也常称作防污染型多重TaqMan探针法。
- UDG (Uracil-DNA Glycosylase), 也称UNG (Uracil-N-glycosylase), 可催化含尿嘧啶的DNA链中的尿嘧啶(dU)碱基和脱氧核糖之间的N-糖苷键发生水解, 从而释放游离尿嘧啶, 主要应用于消除PCR扩增过程中带来的产物污染问题。其防止污染的原理为: 在PCR反应中加入适量的dUTP, 以dUTP替代dTTP掺入DNA中, 形成含dU碱基的PCR扩增产物; 后续进行PCR反应时, 使用UDG酶选择性切割可能被污染而带入的之前PCR扩增产生的含有dU的单链或双链DNA, 从而避免之前的PCR扩增产物可能的污染对于本次PCR扩增带来的负面影响。
- 本产品特别适合用于低丰度或高特异性的目的基因的定量或定性检测。例如一些低丰度的mRNA、lncRNA、小RNA、微生物RNA反转录后的高灵敏度检测, 一些相似度较高的常规染料法难以区分的同源基因或者基因的SNP检测。
- 检测原理: 探针法qPCR不使用荧光染料如SYBR Green等对PCR产物进行荧光染色, 而是采用了荧光基团和淬灭基团(quencher)标记的DNA探针靶向拟通过PCR检测的目标序列(设计的探针结合位点通常位于两条引物结合位点之间)。正常情况下, 探针上的淬灭基团由于空间上的荧光共振能力转移(FRET)而导致荧光基团淬灭。在PCR反应扩增目标序列时, 引物和探针都会退火到目标基因上, 随着引物的延伸, Taq酶的5'→3'外切酶活性会导致结合在目标序列上的探针从5'端开始逐渐被降解。探针的荧光基团和淬灭基团被Taq酶切开后, 淬灭基团的作用消失, 荧光基团就能正常地被激发光所激发而产生荧光了。每经过一个PCR循环, 就会有更多的荧光基团被释放, 荧光强度与新合成的目标片段数量成正比, 从而就可以实现定量检测了。探针通常是目标序列特异性的一段线性DNA, 5'端标记FAM或HEX等荧光基团, 3'端标记BHQ1、TAMRA或MGB等荧光淬灭基团。
- 本产品的特异性好、灵敏度高、兼容性强: 特异性并不仅仅依赖于PCR引物, 还依赖于探针的特异性, 探针和目标基因发生特异性的结合和降解, 才能生成荧光信号, 检测灵敏度和特异性通常要显著高于使用SYBR Green等荧光染料的方法。
- 本产品可用于多重检测: 单个反应孔中, 不同基因对应不同探针, 不同探针对应不同荧光标记, 即可进行多重荧光定量PCR检测。经测试, 在适当优化引物和探针后, 本产品可同时用于2-4个基因的检测。本产品可兼容非常宽泛的产物GC含量和引物Tm值。
- 本产品使用的BeyoFast™ Taq DNA Polymerase是一种与抗体结合的高品质热启动酶, 能够实现便捷高效的热启动。BeyoFast™ Taq DNA Polymerase中的Taq酶与抗Taq酶的单克隆抗体相互结合, 从而抑制了Taq酶的DNA聚合酶活性, 这样可以有效避免在低温条件下由引物和模板DNA非特异性退火或引物二聚体引起的非特异性扩增。在PCR反应的预变性步骤中抗体会被加热失活, 这样可以确保仅在预变性后才会把Taq酶的活性释放出来, 预变性之前不会发生DNA聚合反应, 从而大大提高了PCR反应的特异性、灵敏度和定量检测的准确性。
- 本产品包含了BeyoFast™ Taq DNA Polymerase、UDG酶、PCR Buffer、dNTPs、dUTP、稳定剂和镁离子等所有的通用组分, 使操作更简单、使用更便捷。用户只需自备引物、探针、样品DNA和去离子水即可。
- 本产品提供了Low ROX和High ROX, 广泛兼容于无需ROX和需要Low ROX或High ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪。ROX的作用是用于校正与PCR无关的荧光波动, 从而最大限度减少孔间差异。这种差异可能由多种因素引起, 如移液误差及样品蒸发等。不同的荧光定量PCR仪对ROX的要求不同, 请根据实际所用仪器在配制反应体系时选择高浓度ROX (High ROX)、低浓度ROX (Low ROX)或不加ROX Probe。Probe常用仪器所需ROX类型请参考如下表格。

添加ROX类型	适用PCR仪
不需添加	Bio-Rad: CFX384, CFX96, .MiniOpticon, iCycler IQ, MyiQ and iQ5; Eppendorf: Mastercycler ep realplex and realplex2 s; Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 6000; Roche LightCycler 480; Cepheid SmartCycler; Illumina Eco qPCR
Low ROX	ABI: 7500(Fast), ViiA 7, QuantStudio 6 and 7 Flex Systems; Stratagene: Mx3000P, Mx3005P and Mx4000;

	Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 3000; Bio-Rad/MJ: Chromo4, Opticon 2 and Opticon
High ROX	ABI GeneAmp 5700; ABI PRISM 7000, 7700; ABI 7300, 7900HT(Fast); ABI StepOne(Plus)

- 本产品如果用于常规的96孔板qPCR检测(建议反应体系为20μl), 本产品小包装D7523S可以进行100次检测, 中包装D7523M可进行500次检测, 大包装D7523L可进行2500次检测; 如果用于常规的384孔板qRT-PCR检测(建议反应体系为10μl), 本产品小包装D7523S可以进行200次检测, 中包装D7523M可进行1000次检测, 大包装D7523L可进行5000次检测。

#### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7523S-1	BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)	1ml
D7523S-2	Low ROX (50X)	40μl
D7523S-3	High ROX (50X)	40μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7523M-1	BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)	5ml
D7523M-2	Low ROX (50X)	200μl
D7523M-3	High ROX (50X)	200μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7523L-1	BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)	25ml
D7523L-2	Low ROX (50X)	1ml
D7523L-3	High ROX (50X)	1ml
—	说明书	1份

#### 保存条件:

-20°C避光保存, 一年有效; 4°C避光保存, 一个月有效。尽量避免反复冻融。

#### 注意事项:

- 探针的荧光标记须根据所使用的qPCR仪荧光兼容性来确定。对于需要ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪, 避免使用ROX标记探针。
- 用于多重检测时, 需要适当优化引物和探针, 并使用适当的不同荧光基团标记探针, 确定效果后再进行多重检测。一般建议不超过四重检测。
- 使用前需确保整管试剂完全融化, 上下颠倒轻轻混匀后使用。混匀过程中尽量避免产生气泡。
- 注意引物退火温度, 当退火温度<60°C时, 推荐使用三步法PCR扩增。
- 对于超过350bp或者高GC含量的扩增片段, 建议增加延伸时间至60秒或者采用三步法以提高扩增效率。
- 经测试, 本产品反复冻融10次对使用效果无显著影响。但仍需尽量避免反复冻融本产品, 反复冻融可能使产品性能下降。
- qPCR检测是超高灵敏度的检测, 尽管本产品有很好的防污染效果, PCR反应设置区域还是需尽量避免各种可能的待扩增产物的污染。PCR产物宜密封后丢弃, 以避免超高浓度的PCR产物污染实验环境。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明:

##### 1. PCR反应体系的设置:

- 融解并混匀PCR反应所需的各种溶液。本产品应完全融解并混匀后置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在室温或冰浴上设置PCR反应体系(以96孔板为例, 每孔反应体系为20μl为例):

Reagent	Volume	Final Concentration
BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)	10μl	1X
Forward and Reverse Primer Mix (3μM each)	2μl	300nM
Probe	0.5μl	200nM
Template DNA	2μl	1pg-2μg
Without or Low/High ROX (50X)	0.4μl	1X
RNase-Free Water	Up to 20μl	-

注1: 通常引物的终浓度为0.2-0.5μM时可获得良好的检测效果, 可根据反应重数的增加做相应的增加, 一般在0.1-1.0μM范

围内调整引物的终浓度。扩增效率不高的情况下，可适当提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可适当降低引物浓度。为了获得理想的qPCR的效果，扩增片段的长度建议为80-200bp。

注2：最佳的探针(probe)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。实际使用时请参考仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行探针浓度的调节。通常探针的浓度宜低于引物的浓度，例如引物终浓度为0.3 $\mu$ M，则推荐的探针终浓度为0.2 $\mu$ M，可在0.1-0.3 $\mu$ M范围内调整探针的终浓度。

注3：通常DNA模板的量以1-10ng cDNA或10-100ng基因组DNA为参考用量。因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，如有必要，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。RT-PCR反应得到的cDNA直接作为模板时，其添加量不要超过PCR反应总体积的10%。

注4：96孔板的推荐反应体系为20 $\mu$ l，也可以根据实际实验需求，按比例扩大或缩小反应体系。

注5：建议设置不加模板的阴性对照组。

- c. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。
- d. 将设置好的PCR反应管或PCR反应板置于荧光定量PCR仪上，开始PCR反应。

## 2. PCR反应程序：

在Real-time PCR反应前进行模板的预变性，通常设定为95 $^{\circ}$ C 3分钟，复杂或高GC模板适当延长时间至5分钟。本产品中的BeyoFast™ Taq DNA Polymerase可以在15秒内可完成至少300bp的扩增，可以满足绝大多数的qPCR实验；对于超过350bp或者高GC含量的扩增子，建议增加延伸时间至60秒或者采用三步法以提高扩增效率。建议采用如下的PCR程序，本程序是以ABI QuantStudio™ 6 Flex荧光定量PCR仪为例：

- a. UDG酶处理：50 $^{\circ}$ C 5min
- b. 预变性：95 $^{\circ}$ C 3min
- c. 变性：95 $^{\circ}$ C 15sec
- d. 退火/延伸：60 $^{\circ}$ C 15-30sec
- e. 重复步骤c和步骤d，总共35-45个循环
- f. 使用荧光定量PCR仪提供的软件分析结果

三步法只需在退火/延伸后加一步72 $^{\circ}$ C 30sec，随后重复步骤c、d及增加的这一步骤共35-45个循环即可。

注：以上举例为常规qPCR反应系统，仅供参考。实际反应条件因仪器、模板、引物等的结构不同而各异，需根据模板、引物、目的片段的特点设定最佳反应条件，并根据比例放大或缩小反应体系。

## 常见问题：

### 1. 荧光定量PCR结果不理想，出现特异性不好或扩增效率不高时，可能是由于以下原因造成：

- a. 引物设计不佳。请选择适当的引物设计软件进行引物设计，注意引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。也可以尝试使用有文献报道使用过的引物，或者从碧云天订购经过测试的qPCR引物。
- b. 待扩增片段GC含量偏高。GC含量较高的情况下PCR会变得相对比较困难，此时宜更换引物。
- c. PCR反应体系在室温设置时容易导致非特异性条带，但在使用热启动酶时可以有效避免室温操作导致的非特异性条带的产生。但对于一些较难扩增的产物，可以尝试在冰浴上设置PCR反应体系，以进一步减少非特异性的DNA扩增。
- d. 退火温度不佳，需要优化。这种情况下宜更换引物。
- e. 待扩增片段GC含量较高或长度较长，变性不够充分。此时宜更换引物，使待扩增片段的GC含量和长度适中。
- f. 模板量太低，此时宜适当加大模板量。
- g. 模板中含有抑制PCR反应的物质，可以用适当的DNA纯化方法例如柱纯化等纯化模板DNA。

### 2. 反应条件优化方法：

- a. 引物浓度：通常引物终浓度为0.3 $\mu$ M时可获得良好检测效果，终浓度可以在0.1-1.0 $\mu$ M范围内适当调整。如果希望提高反应特异性，可降低引物浓度；如果希望提高扩增效率，可增加引物的浓度，从而优化反应体系。
- b. 探针浓度：通常探针终浓度为0.2 $\mu$ M时可获得良好检测效果，终浓度可以在0.1-0.5 $\mu$ M范围内适当调整，但不宜超过引物的终浓度。
- c. 退火温度：建议采用两步法PCR，退火温度60 $^{\circ}$ C进行反应。如果希望提高反应特异性，可提高退火温度，以60-64 $^{\circ}$ C作为退火温度的调整范围。在引物Tm值较低而得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法PCR扩增，三步法的退火温度请以56-64 $^{\circ}$ C作为温度设置的参考范围。
- d. 延伸时间：建议采用两步法PCR，延伸15-30秒。对于超过350bp或者高GC含量的扩增子，建议增加延伸时间至60秒或者采用三步法以提高扩增效率。

## 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D7260-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X)	1/5/25ml
D7262-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Low ROX)	1/5/25ml
D7265-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, High ROX)	1/5/25ml
D7268S/M	BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit	100/500次
D7271-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X)	1/5/25ml
D7272-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, Low ROX)	1/5/25ml

D7273-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, High ROX)	1/5/25ml
D7277S/M	BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit	100/500次
D7501-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, 防污染型)	1/5/25ml
D7503-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Low ROX, 防污染型)	1/5/25ml
D7507-1/5/25ml	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, High ROX, 防污染型)	1/5/25ml
D7509S/M	BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (防污染型)	100/500次
D7512-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)	1/5/25ml
D7515-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, Low ROX, 防污染型)	1/5/25ml
D7518-1/5/25ml	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, High ROX, 防污染型)	1/5/25ml
D7523S/M/L	BeyoFast™ Multiplex Probe qPCR Mix (2X, 防污染型)	100/500/2500次
D7528S/M	BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit (防污染型)	100/500次
FASA011-1pc	BeyoGold™封板膜刮板	1个/袋
FSF002	荧光定量PCR用封板膜(ABI分装)	20片/包装
FSF035-100pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型)	100片/包装
FSF039-20pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装)	20片/包装
FSF039-100pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装)	100片/包装
FTUB325-1box	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明)	125排/盒
FTUB325-10bxs	BeyoGold™ qPCR八联排管(0.2ml, 平盖, 透明)	125排/盒, 10盒/箱
FTUB333	荧光定量PCR用96孔板(ABI原装)	20个/包装
FTUB384	荧光定量PCR用384孔板(ABI分装)	20个/包装
FTUB335-1box	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒
FTUB335-5bxs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB337-1box	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒
FTUB337-5bxs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱

Version 2023.07.06