

DSPATH™ 4X One-Step Multiplex Master Mix

(冻干粉)

货号: V5005L, V5006L

产品组成

| Component | V5005L (200 rxn, 20 µl/rxn) | V5006L (5000 rxn, 20 µl/rxn) |
|--|-----------------------------|------------------------------|
| DSPATH™ Multiplex Enzyme Mix (Lyophilized) * | 100 rxn × 2 | 100 rxn × 50 |
| Enzyme Mix Buffer (4X) | 1 ml × 1 | 1 ml × 25 |

*包含逆转录酶, RNase 抑制剂, 热敏 UDG 酶, 热启动 DNA 聚合酶, dNTPs 包含 dUTP。

保存条件

2~8℃

产品简介

DSPATH™ 4X One-Step Multiplex Master Mix 是用于一步法多重荧光定量 PCR 的试剂。它以探针和特异性引物来定量检测 RNA 或 DNA 靶标序列。优化的缓冲液组分可以协助在一个体系内完成多达 4 个 RNA 或 DNA 序列的多重定量 PCR。该混合液以 4 倍浓度提供, 能够加入更多的模板进行反应, 从而提高检测的灵敏度。冻干的 DSPATH™ Multiplex Enzyme Mix 试剂将耐热逆转录酶、热启 Taq DNA 聚合酶、热敏 UDG 酶、dNTPs 等做成冻干品试剂, 制品性能更稳定, 可长期保存。

应用举例

1. 准备 Master Mix:

取出冻干的 DSPATH™ Multiplex Enzyme Mix, 平衡至室温后取 2 支冻干粉溶解于 1ml Enzyme Mix Buffer 中, 避免产生气泡。吹打清洗管壁, 防止冻干粉残留。将管子放在一边静置 30 min。

注意: 重悬的 Master Mix 可以在 -20℃ 保存 1 年, 4℃ 保存 7 天。

2. 准备反应体系

2.1 按下表于冰上配置反应体系。配制多个反应孔时, 请为各组分预留 10% 的余量, 以免移液损失。

2.2 反应体系配好后, 用光学贴膜覆盖反应板, 充分翻转混匀, 离心。

快速反应体系:

| 组分 | 体积 | 终浓度 |
|----------------|------|-----|
| 重悬的 Master Mix | 5 µl | 1X |

| | | |
|-------------|--------|----------------------------------|
| 引物-探针 | 1 µl | 引物: 400-900 nM 探针: 100-250 nM |
| 样品* | 根据需要调整 | 1 pg-100 ng |
| RT-PCR 级超纯水 | 根据需要调整 | — |
| 总体积 | 20 µl | |

标准反应体系:

| 组分 | 体积 | 终浓度 |
|----------------|---------|----------------------------------|
| 重悬的 Master Mix | 12.5 µl | 1X |
| 引物-探针 | 2.5 µl | 引物: 400-900 nM 探针: 100-250 nM |
| 样品* | 根据需要调整 | 1 pg-100 ng |
| RT-PCR 级超纯水 | 根据需要调整 | — |
| 总体积 | 50 µl | |

* DNA 或 RNA 样本均可, 逆转录反应并不会对 DNA 样本造成影响。

3. 运行 RT-qPCR 反应程序

快速反应体系:

| 步骤 | 阶段 | 循环数 | 温度 | 时间 |
|-----|----|-----|-------|--------|
| 逆转录 | 1 | 1 | 55℃ * | 10 min |
| 预变性 | 2 | 1 | 95℃ | 2 min |
| 扩增 | 3 | 45 | 95℃ | 3 sec |
| | | | 60℃ | 30 sec |

标准反应体系:

| 步骤 | 阶段 | 循环数 | 温度 | 时间 |
|-----|----|-----|-------|--------|
| 逆转录 | 1 | 1 | 55℃ * | 10 min |
| 预变性 | 2 | 1 | 95℃ | 2 min |
| 扩增 | 3 | 45 | 95℃ | 15 sec |
| | | | 60℃ | 60 sec |

* 逆转录反应的温度可以在 48℃ 至 55℃ 之间进行调整。

4. 实验数据分析

针对不同的仪器类型, 数据分析也略有不同。一般情况下, 数据分析主要包括:

1. 观察扩增曲线, 根据需要进行设置, 比如:

a. 设置合适的基线和阈值线

b. 将一些典型的异常值从分析中剔除掉

2. 在孔位表或者结果表中, 观察复孔之间的 Ct 值是否有差异;

3. 对于绝对定量, 观察标准曲线的斜率、扩增效率、R² 值、截距、Ct 值和异常值。

本品仅供科学研究使用。