



# Animal Detection Probe Mixture (UNG)

目录号：CW3158M (5 mL)

保存条件：-20℃，如需频繁使用，可存放于2-8℃，尽量避免反复冻融。

## 产品内容

Component	CW3158M 5 mL
2×Animal Detection Probe Mixture (UNG)	5×1 mL
ddH <sub>2</sub> O	5×1 mL

## 产品简介

Animal Detection Probe Mixture (UNG)是一款适用于探针法检测非洲猪瘟病毒 (ASFV)的专用预混液，浓度为2×，包含新型抗体修饰的Taq DNA聚合酶、PCR Buffer、dNTPs、Mg<sup>2+</sup>以及增强剂和稳定剂，使用方便快捷。该产品可以兼容单重与多重探针法qPCR反应体系，同时也可用于基因组DNA靶序列和RNA反转录后的cDNA靶序列检测。

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。

本品含有抗体修饰的高灵敏度工程DNA聚合酶，能在有效减少常温条件下由引物和模板非特异性结合或引物二聚体而产生的非特异性扩增的同时，大幅提升检测灵敏度和扩增效率，酶的激活仅需在95℃孵育30 s，大大缩短了PCR的反应时间。精心优化的PCR缓冲体系，有效抑制了非特异产物的产生，能够显著提高PCR的扩增效率，灵敏度更高。

## 注意事项

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。避免反复冻融本品，反复冻融可能使产品性能下降。本产品长期保存可置于-20℃避光保存。如果在短期内需要频繁使用，可在2-8℃保存。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。

## PCR反应体系

试剂	50 µl体系	25 µl体系	终浓度
2×Animal Detection Probe mixture (UNG)	25 µL	12.5 µL	1×
Forward Primer, 10 µM	1 µL	0.5 µL	0.2 µM <sup>1)</sup>
Reverse Primer, 10 µM	1 µL	0.5 µL	0.2 µM
Probe <sup>2)</sup>	1 µL	0.5 µL	0.2 µM
Template DNA <sup>3)</sup>	X µL	X µL	
50×ROX reference dye (optional) <sup>4)</sup>	1	0.5	1×
ddH <sub>2</sub> O	Up to 50 µL	Up to 25 µL	

注意：

- 1) 通常引物终浓度以0.2 µM可以得到较好结果，可以在0.1-1.0 µM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
需添加High ROX校正的仪器	ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One/Step One Plus等。

## PCR反应体系

步骤	温度	时间	循环
UNG消化	50℃	2 min	1
预变性	95℃	30 s <sup>1)</sup>	1
变性	95℃	10 s	45
退火/延伸	60℃	20 s <sup>2)</sup>	

注意：

1) 本产品所采用的酶在预变性95℃、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℃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℃-64℃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。