



# Animal Detection Lyo Probe Mixture (UNG)

目录号：CW3220S (1 mL)

CW3220M (5 mL)

**保存条件：**-20±5℃，短期使用可存放于2-8℃，尽量避免反复冻融。

## 产品内容

Component	CW3220S 1 mL	CW3220M 5 mL
2×Animal Detection Lyo Probe Mixture (UNG)	1 mL	5 mL
AD冻干保护剂	500 μL	2.5 mL

## 产品简介

Animal Detection Lyo Probe Mixture (UNG)是一款适用于探针法检测DNA病毒的专用可冻干预混液，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，同时也可用于冻干检测试剂的制备。

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。

## 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。
- AD冻干保护剂可置于70℃水浴中融化备用。
- 本产品长期保存可置于-20℃，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 $\mu$ L体系	25 $\mu$ L体系	终浓度
2×Animal Detection Lyo Probe Mixture (UNG)	25 $\mu$ L	12.5 $\mu$ L	1×
AD 冻干保护剂	12.5 $\mu$ L	6.25 $\mu$ L	
Forward Primer, 10 $\mu$ M	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M <sup>1)</sup>
Reverse Primer, 10 $\mu$ M	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
Probe <sup>2)</sup>	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
Template DNA <sup>3)</sup>	X $\mu$ L	X $\mu$ L	
50×ROX reference dye (optional) <sup>4)</sup>	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	1×
ddH <sub>2</sub> O	Up to 50 $\mu$ L	Up to 25 $\mu$ L	

### 注意：

- 1) 通常引物终浓度以0.2  $\mu$ M可以得到较好结果，可以在0.1-1.0  $\mu$ M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，实际使用时请参考仪器说明书，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反应条件

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1 min，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。

## 冻干程序

阶段	步骤	温度	斜率时间	控温时间	真空度Pa	备注
预冷	1	0℃		30min	--	
预冻	2	-50℃	--	3h	--	常温最快速
升华干燥	3	-30℃	--	3h	14	可设置斜率 时间，做斜率 控制升温
	4	-10℃	--	2h	14	
	5	0℃	--	1h	14	
解析干燥	6	30℃	--	4h	14	

### 注意事项

1. 辅料配方发生微量的变化，需重新测定冻干参数，并做相应调整。

2. 冻干设备要求：

冷阱盘管表面温度 $\leq$ -50℃

板层温度 $\leq$ -45℃，温度均一性 $\pm$ 1℃（性能详细说明及验证方案咨询康为技术人员）

可做压升测试（冻干生产前，做泄漏率测试）

3. 环境要求：溶液分装及配置尽量在万级层流保护下进行，环境空间尘埃掉落进溶液中成为冻干过程的晶核，影响溶液的结晶的过冷度，导致产品质量不一致性。