

dPCR 10×SHENmix for probes

使用说明书

货号: 1701880 (仅供研究用)

一、试剂盒简介

dPCR 10×SHENmix 是专为检测以 DNA 为模板的数字 PCR 实验而设计的, 这种即用型预混液包含除引物、探针以及模板外的所有成分, 其中包含的 DNA 聚合酶具有热稳定特性可使样品分裂成数以万计的微滴, 同时使 DNA 聚合酶在低于 95°C 时下处于失活状态, 保证 PCR 体系具有极高的扩增灵敏度和特异性。dPCR 10×SHENmix 适用于探针法数字 PCR 系统。

二、试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分表

序号	组分	装量	储存条件
1	10×dPCR A 液	250μL×2 管	-25°C to -15°C
2	10×dPCR B 液	250μL×1 管	-25°C to -15°C, 避光

三、规格:

200 Reactions (25μL/Reactions)

四、有效期:

规定储存条件下 24 个月, 具体见试剂盒标签。

五、保存条件

试剂盒应-30°C到-15°C保存, 尽量避免反复冻融。

六、适用仪器

推荐使用 Naica™ Crystal Digital PCR 系统, 其他数字 PCR 系统是否适用需自行验证。

使用前请认真阅读以下注意事项:

- ◇ 使用前请先置于室温下完全融化, 为避免在存储过程中出现分层, 需在涡旋振荡仪上垂直低速涡旋混匀 2min, 期间每隔 30s 迷你离心机上快速离心一次 (共需离心 4 次), 注意垂直振荡避免起泡。

七、使用操作

1. 用灭菌超纯水或 DNA 稀释液稀释 DNA 模板至所需浓度 (参考数字 PCR 仪推荐的浓度范围), 置于冰上备用。
2. 将试剂置于室温下解冻, 在涡旋振荡仪上垂直低速涡旋混匀 2min, 期间每隔 30s 迷你离心机上快速离心一次 (共需离心 4 次), 注意垂直振荡避免起泡。
3. 根据所需反应个数+1 配制 dPCR 预混液 (不添加模板), 具体配比参照表 2, 将预混液涡旋振荡仪上垂直振荡 2min, 期间每隔 30s 迷你离心机上快速离心一次 (共需离心 4 次), 注意垂直振荡避

免起泡。然后立即按照总体积减去模板体积的量将反应混液平均分配至各反应管中，最后添加模板。

4. 将配制完成的各反应管置于涡旋振荡仪上垂直振荡混匀，期间每隔 20s 轻微离心将液体收集于底部，如此持续 3 次，约 1min 左右，避免产生气泡。

5. 立即将反应液添加到相应的芯片孔井或目标管中，不要与内置油相接触。

表 2. dPCR 反应体系

试剂组分	终浓度 (单孔)
10×dPCR A 液	1×
10×dPCR B 液	0.5×
限制性内切酶 (可选)	1μL/25μL* (可选)
Primer-F	1μM*
Primer-R	1μM*
Probe	250nM*
荧光素	100nM
DNA 模板	数字 PCR 仪推荐的浓度检测范围
无菌双蒸水	补到数字 PCR 仪推荐的承载体积

注意事项:

- ❖ 上述第 2 步到第 3 步，以及第 4 步到第 5 步之间的时间间隔尽量少于 3min。
- ❖ 限制性内切酶的加入是可选步骤，仅适用于模板为质粒或基因组较大等情况下使用，其具体限制性内切酶的种类需根据质粒或基因组的实际序列而决定（其酶切位点应避开要检测的靶标序列），推荐使用其贮存液成分不含表面活性剂的限制性内切酶（具体可咨询本公司）。
- ❖ 引物、探针的浓度根据实验需要进行优化。
- ❖ 在使用 Naica™ Crystal Digital PCR 系统时，每次实验都必须加入参比荧光，需自行购买。
- ❖ 使用前、预混液配制后、上样前这 3 个阶段需特别注意充分混匀，否则可能会造成微滴不均一或检测拷贝数不稳定的现象。

6. PCR 反应程序

请根据实际实验情况，选择适合的反应程序（以 Nacia™ sapphire chips 为例）:

表 3. 反应程序

步骤	温度°C	压力 mbar	持续时间
分区	40	AP 到+950	12min
酶切* (可选)	37*	+950	15min
预变性	95	+950	10min
PCR(40-45 个循环)	95	+950	15s
	60	+950	1min
释压	25	AP	33min

- ❖ 酶切反应为可选步骤，其中反应温度应根据所用内切酶说明书上的推荐温度而设定。
- ❖ PCR 阶段可尝试三步法，退火温度可根据引物的 T_m 值在 $55^{\circ}\text{C}\sim 65^{\circ}\text{C}$ 之间进行调整。

八、服务支持



湖州申科生物技术有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910