



Serum(Plasma) Direct qPCR Kit-Taqman

Cat.No.DQT-0411T/04111/04112/04113

Serum(Plasma) Direct qPCR Kit(UNG) -Taqman

Cat.No.DQT-0412T/04121/04122/04123

For fast blood direct qPCR using serum, plasma

For performing qPCR directly from
serum,plasma without prior DNA purification

Research use only



目 录

产品介绍	3
产品特点	4
试剂盒应用	4
产品质量控制	4
试剂盒内容	5
试剂盒组分信息	6
储存条件	7
注意事项	7
操作前准备事项	8
实验材料和设备	8
安全性	8
操作指南	9
Taqman 探针法血清/血浆直接 qPCR 操作步骤	10
操作示意图	13
问题分析指南	14

产品介绍

本产品采用独特的裂解缓冲液体系，能直接以血清或血浆作为模板进行 qPCR，无需纯化血液 DNA，极大的避免了操作过程中的外源污染，缩短检测时间。特别适合于检测、分析血液中的 DNA 病毒及细菌等微生物。

2x S-qPCR Easy™ Mix-Taqman 包含本公司特有的 Foregene D-Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、Taq Reaction Buffer、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂等，对血清或血浆有极强的耐受性，血清或血浆加入量最多能占体系的 30%。

2x S-qPCR Easy™ Mix(UNG)-Taqman 在 2x S-qPCR Easy™ Mix-Taqman 的基础上用 dUTP 替代了 dTTP，并同时加入能够降解含有 dUTP 模板的 UNG 酶 (Uracil-N-glycosylase)。在 PCR 反应前，利用 UNG 酶降解含有尿嘧啶的 PCR 产物，UNG 酶对不含有尿嘧啶的模板不会造成任何影响，从而保证扩增的特异性和准确性，防止了大规模基因检测时可能出现的 PCR 产物污染问题。

D-Taq DNA polymerase 是 Foregene 为直接 PCR 反应专门研制出的 DNA polymerase。D-Taq DNA polymerase 对多种 PCR 反应抑制剂具有极强的耐受性、在各种复杂反应体系中均能高效扩增痕量的 DNA，扩增速度可达 2Kb/min，特别适合进行直接 PCR 反应。

产品特点

- ◆ 无需进行费时而昂贵的 DNA 纯化，直接使用血清或血浆作为 qPCR 模板。
- ◆ 体系对血液的耐受能力强，可以灵敏的检测出血液中基因组和外源目的 DNA 片段。
- ◆ 2x S-qPCR Easy™ Mix-Taqman(2x S-qPCR Easy™ Mix(UNG)-Taqman)耐受度高，血清/血浆最大加入量为 PCR 体系的 30%。
- ◆ 样本全封闭式操作，无需担心样本污染和 qPCR 结果假阳性。
- ◆ 防污染 PCR 体系 2x S-qPCR Easy™ Mix(UNG)-Taqman，有效消除由 PCR 产物所引起的污染，保证扩增的特异性和准确性。

试剂盒应用

- ◆ 专用于血清或血浆直接 qPCR 鉴定。
- ◆ 可以直接检测血清或血浆中的病原微生物。

产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System),每一批次的血清/血浆直接 qPCR 系列试剂盒-Taqman 都严格进行多次测试,确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

试剂盒内容

Serum(Plasma) Direct qPCR Kit-Taqman 血清/血浆直接 qPCR 试剂盒-Taqman				
试剂盒组成	DQT-0411T	DQT-04111	DQT-04112	DQT-04113
	50 次	200 次	500 次	2000 次
2x S-qPCR Easy™ Mix-Taqman	500µl	1ml x2	1.7ml x3	1.7ml x12
20x ROX Reference Dye	100µl	200µl	500µl	1ml x2
说明书	1 份	1 份	1 份	1 份

Serum(Plasma) Direct qPCR Kit (UNG)-Taqman 血清/血浆直接 qPCR 试剂盒(UNG)-Taqman				
试剂盒组成	DQT-0412T	DQT-04121	DQT-04122	DQT-04123
	50 次	200 次	500 次	2000 次
2x S-qPCR Easy™ Mix(UNG)-Taqman	500µl	1ml x2	1.7ml x3	1.7ml x12
20x ROX Reference Dye	100µl	200µl	500µl	1ml x2
说明书	1 份	1 份	1 份	1 份

试剂盒组分信息

- ◆ **2x S-qPCR Easy™ Mix-Taqman:** 包括 Foregene 为直接 PCR 反应特别改造的 D-Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂等。PCR 反应时，只需将适当的血清或血浆、引物、ddH₂O 添加到 2x S-qPCR Easy™ Mix-Taqman 中即可用于 qPCR 反应。
- ◆ **2x S-qPCR Easy™ Mix(UNG)-Taqman:** 在 2x S-qPCR Easy™ Mix-Taqman 的基础上用 dUTP 替代了 dTTP，并同时加入能够降解含有 dUTP 模板的 UNG 酶，从而能够有效防止 PCR 扩增产物污染。
- ◆ **ROX Reference Dye:** 只使用在 ABI、Stratagene 等公司的荧光定量 PCR 仪上，用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差(具体用量见表 1)。Roche、Bio-Rad、Eppendorf 等荧光定量 PCR 仪不必使用(当使用以上未提及仪器时，请参考仪器的说明书或与仪器厂家联系进行确认是否需要加入 ROX Reference Dye 进行校正)。

表 1: 不同荧光定量 PCR 仪中 ROX Reference Dye 的用量

荧光定量 PCR 仪	ROX Reference Dye 终浓度
ABI PRISM7000/7300/7700/7900HT/Step One 等	1x (如 20μl 体系，加入 1μl 20xROX Reference Dye)
ABI 7500/7500 Fast 和 Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000 等	0.5x (如 20μl 体系，加入 0.5μl 20xROX Reference Dye)

储存条件

1. 运输条件

- ◆ 全程低温冰盒运输，保证整个试剂盒处于 $< 4^{\circ}\text{C}$ 状态。

2. 保存条件

- ◆ 本试剂盒保存在 -20°C 。
- ◆ 2xqPCR Mix 若频繁使用，也可置于 4°C 短期保存(限 10 天内用完)；20x ROX Reference Dye 可置于 4°C 或 -20°C 长期保存。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 不能使用全血或是含有血红细胞的样本作为 qPCR 模板，请使用血清、血浆或者纯化的 DNA 作为模板。
- ◆ 请尽量使用新近处理的样本进行相关实验；若是冻存的样本，避免反复冻融，否则会导致作为 PCR 模板的 DNA 片段较小，影响 PCR 效率。
- ◆ 注意实验用具的清洁以及实验的操作手法，避免样本间的交叉污染。
- ◆ 2x qPCR Mix 应避免反复冻融，否则会影响 PCR 效率。
- ◆ 2x qPCR Mix 在环境温度较高时，可能会变浑浊，可置于冰上放置 1-2min，待溶液澄清，上下颠倒混匀 3-5 次后再使用。

操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。血清/血浆直接 qPCR 系列试剂盒-Taqman 操作简单、方便、快速，说明书提供了整个试剂盒的完整信息和正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

实验材料和设备

- ◆ 新鲜或保存好的血清或血浆或者纯化的 DNA。
- ◆ 0.2ml 无菌 PCR 管。
- ◆ 定量 PCR 仪、移液器等。

安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。

操作指南

可根据实验的目的和要求选择普通试剂盒或防 PCR 产物污染系列试剂盒。

材料取用说明

- ◆ 尽量取用新近处理的血清或血浆样本进行实验，冻存样本避免反复冻融。
- ◆ 若是进行基因组上的目的片段检测，我们建议尽量使用少量的样本量作为模板；若是检测血液样本中某种病毒或细菌等的目的片段，我们建议扩大 PCR 体系并使用较大量的模板。血清/血浆作为模板最多占 PCR 体系的 30%。

全血预处理

- ◆ 如果样本为血清、血浆或是纯化的 DNA，直接作为模板进行 qPCR 检测。
- ◆ 如果样本为抗凝全血，请先使用 Foregene Blood DNA Mini Kit 纯化基因组 DNA 或离心操作处理全血分离得到血清或血浆样本，再以血清或血浆作为模板进行的 qPCR 检测。

Taqman 探针法血清/血浆直接 qPCR 操作步骤

该试剂盒操作简便，只需取适量的血清、血浆或 DNA 样本加入相应的 2× S-qPCR Easy™ Mix 中，添加相应引物、ddH₂O 等补齐体系即可进行 PCR 扩增。具体的操作见下详细操作步骤：

A: Real Time PCR 体系配制

1. 取出 2× S-qPCR Easy™ Mix、20× ROX Reference Dye、引物等置于碎冰上，使其自然融化。融化后，上下颠倒混匀试剂，可用离心机瞬时离心收集散落在管壁和盖子上的液体。

注意：2× S-qPCR Easy™ Mix 放在室温或握在手中时间较长会变浑浊，可将其置于冰上 2-5min，待溶液澄清，上下颠倒混匀 3-5 次后再使用。

2. 将适量的血清、血浆或 DNA 样本、引物或 20× ROX Reference Dye 添加到 2× S-qPCR Easy™ Mix 中，并用 ddH₂O 使其稀释为 1×(qPCR 体系配制见下表 2)。

注意：该操作应在冰浴上进行，长时间的室温放置会降低产品性能。

表 2: qPCR 反应体系配制

PCR 体系添加内容	20μl 反应体系	50μl 反应体系	终浓度
2× S-qPCR Easy™ Mix ^{1*}	10μl	25μl	1×
Forward Primer(10μM)	0.8μl	2μl	0.4μM ^{2*}
Reverse Primer(10μM)	0.8μl	2μl	0.4μM ^{2*}
Probe(4μM)	1μl	2.5μl	0.2μM ^{3*}
Template (Serum/plasma/DNA)	Xμl	Xμl	
20× ROX Reference Dye	-		4*
ddH ₂ O(灭菌蒸馏水)	Add to 20μl	Add to 50μl	

1*：根据试剂盒的不同，2× S-qPCR Easy™ Mix 分别为：2× S-qPCR Easy™ Mix –Taqman 或 2× S-qPCR Easy™ Mix (UNG)-Taqman。

2*：通常引物终浓度为 0.4μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1-0.5μM 范围内调整引物浓度。

3*：通常探针终浓度为 0.2μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.05-0.3μM 范围内调整探针浓度。

4*: 根据不同的荧光定量 PCR 仪, 选择合适终浓度的 ROX Reference Dye。常见荧光定量 PCR 仪的最适 ROX Reference Dye 浓度参照组分信息中表 1(第 6 页)。

B: Real Time PCR 反应

根据 A 步骤配制好 PCR 体系, 混匀, 根据优化好的 PCR 条件(退火温度等)进行 PCR 反应(两步法反应条件见下表 3-1, 三步法反应条件见下表 3-2)。

表 3-1: 两步法

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	37°C	5 min	1	UNG酶处理 ^{1*}
2	95°C	5min	1	灭活UNG酶&预变性
2(两步)	94°C	10sec	35-40	循环中模板变性
	60-65°C ^{2*}	20-30sec		退火/延伸/荧光采集

1*: 可选步骤, 使用 2x S-qPCR EasyTM Mix (UNG)-Taqman 时, 通过该步骤有效去除污染; 若使用 2x S-qPCR EasyTM Mix –Taqman 可跳过该步骤。

2*: 推荐退火/延伸温度为 60°C。在具体操作中, 需要根据目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况在 60-66°C 范围内优化。

表 3-2: 三步法

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	37°C	5 min	1	UNG酶处理 ^{1*}
2	95°C	5min	1	灭活UNG酶&预变性
3(三步)	94°C	10sec	30-45	循环中模板变性
	55-65°C	20-30sec		退火
	72°C	20-30sec		延伸/荧光采集

注意: 对于大多数模板, 预变性过程只需94-95°C 1-2分钟即可。如果模板的GC含量很高, 可以适当延长预变性时间。为了得到最佳的PCR效果, 针对不同的模板、不同的引物可采用梯度PCR优化反应条件。PCR反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。在具体操作中需要根据模板类型、目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的GC含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件, 包括退火温度, 延伸时间等。

PCR 对照反应

在qPCR结果分析时，不管是阳性结果或阴性结果，如果没有对照反应，我们都不能确定结果是否可靠。为了便于后续实验结果的分析，我们建议在进行qPCR时，设置阳性和阴性PCR对照反应以便于排除假阳性或假阴性的干扰。

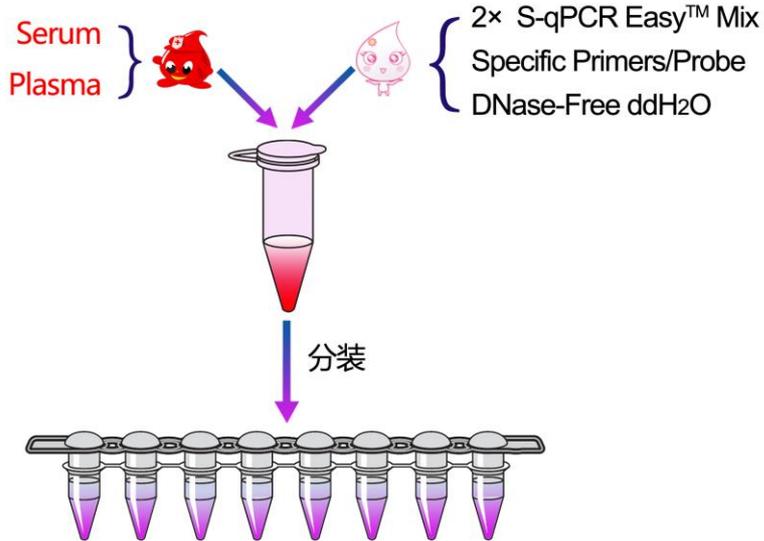
A: 阳性对照

采用纯化的样本DNA(50-200ng)作为模板，加入qPCR预混液作为阳性对照，以确定qPCR反应体系和条件的正确性以及2x S-qPCR Easy™ Mix有效性。

B: 阴性对照

建议在每次试验过程中都加入除DNA模板外的PCR反应体系作为阴性对照，以监控试验过程中是否存在污染。

操作示意图



qPCR 反应体系

组分	体积
(for 20µl PCR reaction)	
2× S-qPCR Easy™ Mix-Taqman	10µl
Specific Primers/Probe	2.6µl
Template	2µl
DNase-Free ddH ₂ O	5.4µl

qPCR 反应体系(UNG)

组分	体积
(for 20µl PCR reaction)	
2× S-qPCR Easy™ Mix-Taqman (UNG)-Taqman	10µl
Specific Primers/Probe	2.6µl
Template	2µl
DNase-Free ddH ₂ O	5.4µl



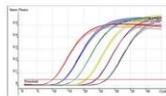
qPCR

qPCR 反应条件

Step	Temp	Time	Cycles
1	95°C	5min	1
2	94°C	10sec	} 35-40
3	60-66°C	20-30sec	

qPCR 反应条件(UNG)

Step	Temp	Time	Cycles
1	37°C	5min	1
2	95°C	5min	1
3	94°C	10sec	} 35-40
4	60-66°C	20-30sec	



qPCR analysis

问题分析指南

以下针对血清/血浆直接 qPCR 系列试剂盒在实验中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-83360257 或 E-mail: Tech@foregene.com。

正对照、待测样本均无目的片段的扩增信号或 Ct 值过大

1. 荧光定量 PCR 仪的设置不正确。

建议：确保荧光定量 PCR 仪在荧光的采集步骤、种类以及检测位置等参数设置正确，然后再进行试验。

2. PCR 试剂保存不当失去活性。

建议：2× S-qPCR Easy™ Mix 应保存于-20℃，使用时避免反复冻融。若使用频繁，可在 4℃短时间存放。

3. qPCR 反应条件不合适。

建议：使用推荐的 PCR 程序进行试验。必要时，以纯化 DNA 为模板对反应条件进行优化后，再进行大规模检测。

4. 扩增产物过长。

建议：PCR 扩增产物长度以 60bp~200bp 为宜，不能超过 300bp。

5. 引物或探针浓度不合适。

建议：适当调整反应体系中引物或探针的浓度。

6. 引物或探针设计问题。

建议：尝试重新设计引物或探针进行检查。

试验重复性差

1. 未引入校正系统。

建议：根据各自荧光定量 PCR 仪的要求，进行系统校正。

2. 加样误差。

建议：规范使用微量移液器，使用硅化处理后的枪头进行加样。

3. 反应管侧壁残留液体或有气泡。

建议：进行扩增反应之前，将完成加样的反应管进行瞬时离心，仔细检查反应管内是否有气泡残留。

4. 模板浓度太低或抑制物浓度过高。

建议：适当调整模板用量。

5. 反应体系过小。

建议：适当增大 PCR 反应体系。

正对照扩增信号正常，待测样本无目的片段的扩增信号或 Ct 值过大

1. 样本保存不当或保存时间过久，DNA 基因组已经降解。

建议：尽量使用新鲜样本进行 qPCR 检测。

2. 样本中抑制物过多。

建议：在 PCR 反应体系 5-30%范围内优化模板加入量。

3. PCR 循环数不足。

建议：适当增加 PCR 的循环数，推荐在 35-40 循环为佳。

空白对照出现目的片段的扩增曲线

1. 操作工具或试剂污染。

建议：实验所有试剂或器材均应高压灭菌。操作时应小心轻柔，防止将样品吸入加样枪内或溅出离心管外。

2. 样本间交叉污染。

建议：每个取样器只对一个样本使用；或取完一个样本后，将取样器刃口浸入 2% 的次氯酸钠溶液中，反复涮洗，然后用干净的纸巾擦干残液。

3. PCR 产物污染。

建议：如果实验室经常检测同类型样本，最好使用含 UNG 防 PCR 产物污染系统的试剂盒进行实验。

使用 ROX 染料校正后的荧光信号不正常

1. ROX Reference Dye 加入量过多或过少。

建议：根据表 1 的推荐用量的 ROX Reference Dye。

2. 荧光定量 PCR 仪器颜色校正不准确。

建议：根据荧光定量 PCR 仪说明进行重新校正。

中国·福际 World's Foregene

成都福际生物技术有限公司

电话: 028-83360257, 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

