



## Zebra Fish Direct qPCR Kit-SYBR Green I

Cat.No.DQS-0131T/01311/01312/01313

## Zebra Fish Direct qPCR Kit(UNG)-SYBR Green I

Cat.No.DQS-0132T/01321/01322/01323

For zebra fish direct qPCR using  $\leq 10\text{mg}$  tissue (or  $\leq 3\text{mg}$  tail fin or 10 eggs)

For performing qPCR directly from zebra fish tissue 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
● 斑马鱼直接 qPCR 操作步骤	9
对照反应	11
操作示意图	12
问题分析指南	13

## 产品介绍

本产品采用独特的裂解缓冲液体系可以快速的从斑马鱼等淡水鱼类组织、尾鳍或鱼卵样本中释放出基因组 DNA，用于 qPCR 反应，因此特别适合大规模基因检测。

裂解缓冲液释放基因组 DNA 过程在 65°C 条件下 10-30 min 内完成，不需要其他去蛋白、RNA 等的过程，即可将释放出的微量 DNA 作为模板进行 qPCR 反应。

2x F-qPCR Easy™ Mix-SYBR 具有很强的 PCR 反应抑制物耐受性，能以待测样本的裂解液为模板，进行高效特异性扩增。该试剂包含 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、反应缓冲液、PCR 优化剂和稳定剂以及优化配比的 SYBR Green I。与裂解缓冲液配合使用能够快速简便地对样品进行检测，并具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。

2x F-qPCR Easy™ Mix(UNG)-SYBR 在 2x F-qPCR Easy™ Mix-SYBR 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。

## 产品特点

- ◆ 无需进行费时而昂贵的 DNA 纯化。
- ◆ 样品需求量小，只需取直径 2-5mm 的鱼尾鳍或 3-10 枚鱼卵即可进行实验。
- ◆ 无需研磨、破碎等特殊处理，操作简便。
- ◆ 优化的 qPCR 体系，使 PCR 具有更高的特异性、更强的 PCR 反应抑制物耐受性。
- ◆ 防污染 PCR 体系 **2x F-qPCR Easy™ Mix(UNG)-SYBR**，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

- ◆ 适用范围：斑马鱼等淡水鱼类。
- ◆ 样本裂解释放的 DNA：仅用作 PCR 模板。
- ◆ 试剂盒可用于以下用途：转基因鉴定、基因分型等。

## 产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准，每一批次的斑马鱼直接 qPCR 试剂盒-SYBR Green I 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

Zebra Fish Direct qPCR Kit-SYBR Green I 斑马鱼直接 qPCR 试剂盒-SYBR Green I					
试剂盒组成		DQS-0131T	DQS-01311	DQS-01312	DQS-01313
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer QFP	5ml	20ml	50ml	100mlx2
	Foregene Protease	220µl	880µl	1.1mlx2	8.8ml
Part II	2x F-qPCR Easy™ Mix-SYBR	500µl	1ml	1.7mlx3	1.7mlx12
	50x ROX Reference Dye	200µl	400µl	1mlx2	1mlx4
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

Zebra Fish Direct qPCR Kit(UNG)-SYBR Green I 斑马鱼直接 qPCR 试剂盒(UNG)-SYBR Green I					
试剂盒组成		DQS-0132T	DQS-01321	DQS-01322	DQS-01323
		50 次	200 次	500 次	2000 次
Part I	Buffer QFP	5ml	20ml	50ml	100mlx2
	Foregene Protease	220µl	880µl	1.1mlx2	8.8ml
Part II	2x F-qPCR Easy™ Mix(UNG)-SYBR	500µl	1ml	1.7mlx3	1.7mlx12
	50xROX Reference Dye	200µl	400µl	1mlx2	1mlx4
说明书		1 份	1 份	1 份	1 份

## 试剂盒组分信息

- ◆ Buffer QFP: 提供斑马鱼组织裂解反应所需的环境。
- ◆ Foregene Protease: 在 Buffer QFP 环境下, 裂解斑马鱼组织, 释放基因组 DNA。
- ◆ 2x F-qPCR Easy™ Mix-SYBR: 包含福际生物特别改造 Taq DNA Polymerase、dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、反应缓冲液、优化配比的 SYBR Green I、PCR 反应增强剂、优化剂以及稳定剂等。qPCR 反应时, 只需将适当的 DNA 模板、引物、ddH<sub>2</sub>O 添加到 2xF-qPCR Easy™ Mix-SYBR 中即可用于 qPCR 反应。
- ◆ 2x F-qPCR Easy™ Mix(UNG)-SYBR: 在 2x F-qPCR Easy™ Mix-SYBR 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 仪时不必使用(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	5x (如 20μl 体系, 加入 2μl 50xROX Reference Dye)
ABI 7500/7500 Fast 和 Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000 等	1x (如 20μl 体系, 加入 0.4μl 50xROX Reference Dye)

## 储存条件

### 1. 运输条件

- ◆ 全程低温冰盒运输，保证试剂盒 Part I、Part II 处于  $< 4^{\circ}\text{C}$  状态。

### 2. 保存条件

- ◆ 试剂盒 Part I 保存在常温或  $2-8^{\circ}\text{C}$ 。
  - ❖ 试剂 Buffer QFP，在干燥条件下，可保存 12 个月；如需保存更长时间可置于  $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

注意：若低温保存，溶液容易产生沉淀。在使用前务必将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间，必要时可在  $37^{\circ}\text{C}$  水浴中预热 10 分钟，以溶解沉淀，混匀后再使用。
  - ❖ 试剂 Foregene Protease，为保证其更好的活性和稳定性，请保存于  $4^{\circ}\text{C}$ 。
- ◆ 试剂盒 Part II 保存在  $-20^{\circ}\text{C}$ 。
  - ❖ 试剂  $2\times$  qPCR Mix，若频繁使用，也可置于  $4^{\circ}\text{C}$  短期保存(限 10 天内用完)。
  - ❖ 试剂  $50\times$  ROX Reference Dye， $-20^{\circ}\text{C}$  避光保存。

### 注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 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。
- ◆ 请尽量使用新近采取的斑马鱼样本进行实验，若组织样本存储较长时间，请避免样本反复冻融。
- ◆ 若 Buffer QFP 有沉淀析出，可放置于  $37^{\circ}\text{C}$  待沉淀消失，并摇匀溶液后使用。
- ◆ Foregene Protease 具有独特配方，请置于  $4^{\circ}\text{C}$  存储，切勿置于  $-20^{\circ}\text{C}$ 。
- ◆  $2\times$  qPCR Mix 应避免反复冻融，否则会影响 PCR 效率。
- ◆  $2\times$  qPCR Mix 含有 SYBR Green I，请避光保存。
- ◆  $2\times$  qPCR Mix 冻存后可能会产生白色或淡黄色的沉淀。为了避免沉淀导致溶液成分不均匀，试剂解冻后于室温条件下，轻柔上下颠倒混匀数次直至完全溶解，轻微离心后再使用。

## 操作前准备事项

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读说明书。斑马鱼直接 qPCR 系列试剂盒操作简单、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

- ◆ 斑马鱼尾鳍或鱼卵(新鲜的、冷冻保存的)。
- ◆ 1.5ml 或 2ml 无菌离心管、0.2ml 无菌 PCR 管。
- ◆ 台式离心机( $\geq 13,400\times g$ )、荧光定量 PCR 仪、金属浴、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。
- ◆ Foregene Protease: 增敏剂，刺激性。

## 操作指南

### 预防样本间交叉污染

为了避免样本间交叉污染，每次取样后都需要将取样器材的刃口或与样本直接接触的部位浸入 2%次氯酸钠溶液中，反复洗刷数次进行清洗，然后用干净的纸巾擦干残余液体后再进行使用。为了实验方便，也可准备多个取样器材，在使用完后进行统一清洗，确保每一单独样本均使用的是无污染的取样器材。

## 操作说明：斑马鱼直接 qPCR 操作步骤

### A. 样本 DNA 释放

1. 根据准备取用的组织大小，按照每 100 $\mu$ l Buffer QFP 加入 4 $\mu$ l Foregene Protease 的比例配制成裂解液，轻微涡旋混匀后加入离心管中。

**注意：** Buffer QFP 与 Foregene Protease 混合后不宜长期保存，配制后请尽快使用。

2. 剪取直径 2-5mm 的鱼尾鳍或取 3-10 枚鱼卵放入上述离心管中，轻微涡旋混匀，确保裂解液能够浸没组织。

3. 65 $^{\circ}$ C 孵育 10-30min，然后 95 $^{\circ}$ C 处理 5min。

**注意：** 65 $^{\circ}$ C 孵育，一般只需 10min 即可满足多数 PCR 需求。若需要的 DNA 量较大或样品较难酶解，可以将时间延长至 30min。组织块不需完全酶解，残余的部分在后续离心步骤去除即可。

4. 短暂离心，转移上清至新的离心管，4 $^{\circ}$ C (可保存 20 天)或-20 $^{\circ}$ C 放置备用或直接用于 PCR 扩增。

### B. qPCR 反应鉴定

1. 将 2 $\times$  qPCR Mix 和其它冻存组分置于冰上解冻，单独混匀后置于冰上待用。

**注意：** 解冻后的 2 $\times$  qPCR Mix 可能会出现白色或淡黄色沉淀，可于室温条件下，轻柔上下颠倒混匀数次直至完全溶解(请勿使用涡旋仪振荡混匀)，轻微离心后再使用。

2. 在离心管中按比例加入反应所需的 2x qPCR Mix、(ROX)、引物、H<sub>2</sub>O 制备成 PCR 预混液(见表 2)。置于涡旋仪上充分涡旋混匀后, 瞬时离心将预混液集于管底, 并分装至适当的 PCR 反应管中。

3. 取适量的 A 步骤得到的裂解混合液作为模板加入上述配制的 qPCR 体系中(已分装到 PCR 管中的 PCR 体系)。

注意: 以裂解产物作为模板时, 加入量以 PCR 体系的 5-10%之间最佳, 不能超过 20%。如 20 $\mu$ l 的 PCR 体系中, 加入 1-2 $\mu$ l 裂解产物即可, 但不能超过 4 $\mu$ l。

4. 将反应管放入荧光定量 PCR 仪, 根据优化好的 PCR 条件(退火温度等)进行 PCR 反应(见表 3)。

注意: 尽量使用优化后的条件进行 PCR 反应, 可以得到更好的结果。

**表 2: qPCR 反应体系配制**

PCR 体系添加内容	20 $\mu$ l 反应体系	50 $\mu$ l 反应体系	终浓度
2x qPCR Mix <sup>1*</sup>	10 $\mu$ l	25 $\mu$ l	1x
50x ROX Reference Dye	-	-	2*
Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	1.25 $\mu$ l	0.25 $\mu$ M <sup>3*</sup>
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	1.25 $\mu$ l	0.25 $\mu$ M <sup>3*</sup>
DNA模板 <sup>4*</sup>	X $\mu$ l	X $\mu$ l	
ddH <sub>2</sub> O(灭菌蒸馏水)	Add to 20 $\mu$ l	Add to 50 $\mu$ l	

1\*: 根据试剂盒的不同, 2x qPCR Mix分别为: 2x F-qPCR Easy<sup>TM</sup> Mix-SYBR或2x F-qPCR Easy<sup>TM</sup> Mix(UNG)-SYBR。

2\*: 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)。

3\*: 通常引物终浓度为0.25 $\mu$ M可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在0.1-0.5 $\mu$ M范围内调整引物浓度。

4\*: 裂解产物作为PCR模板, 加入量在PCR体系5-10%之间最佳, 实际操作可进行模板加入量条件摸索, 找到最佳模板用量。

**表 3: qPCR 反应条件**

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	37°C	5 min	1	UNG酶处理 <sup>1*</sup>
2	95°C	5 min	1	灭活UNG酶&预变性
3	94°C	10sec	35-40	变性
4	60-66°C <sup>2*</sup>	20-30sec		退火/延伸/荧光采集

5	65-95°C	仪器默认设置	绘制溶解曲线
---	---------	--------	--------

1\*: 可选步骤, 使用**2x F-qPCR Easy™ Mix(UNG)-SYBR**时, 通过该步骤有效去除污染; 若使用**2x F-qPCR Easy™ Mix-SYBR**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。若两步法PCR反应性能较差时, 可变更为三步法PCR程序。

## 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PCR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。

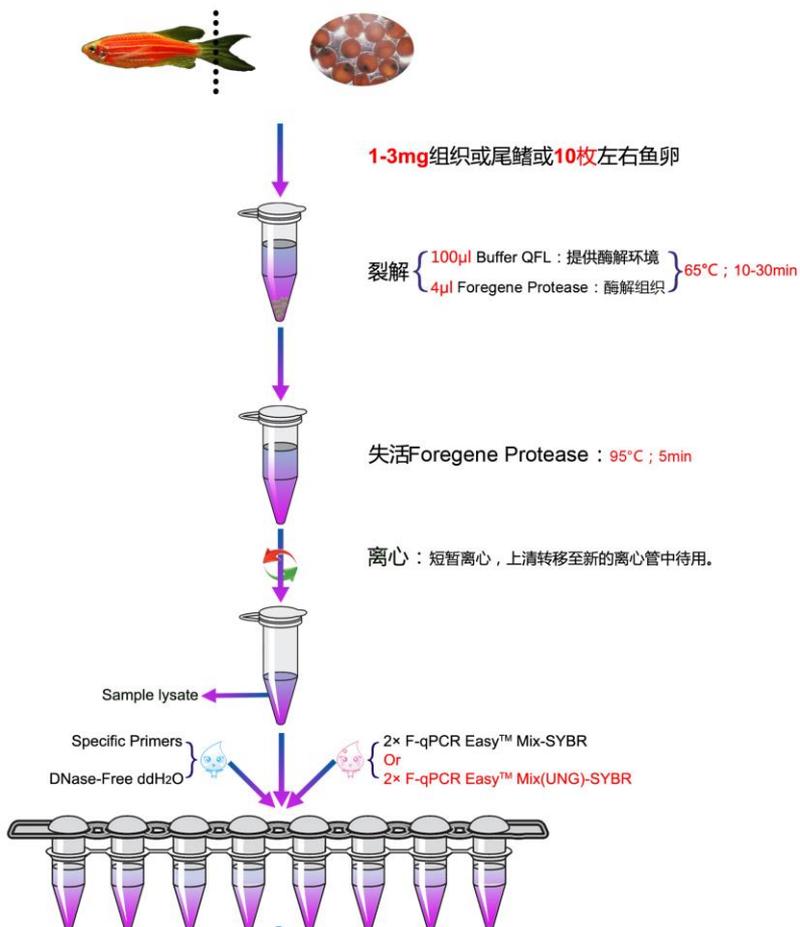
### A: 阳性对照

采用纯化的样本DNA(50-200ng)作为模板, 加入PCR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 qPCR Mix有效性。

### B: 阴性对照

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

# 操作示意图



**qPCR 反应体系**

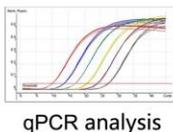
组分	体积
(for 20µl PCR reaction)	
2× F-qPCR Easy™ Mix(UNG)-SYBR	10µl
50× ROX Reference Dye	-*
Specific Primers	Xµl
Sample lysate	2µl
DNase-Free ddH <sub>2</sub> O	up to 20µl

\*: 根据定量PCR仪器不同选择合适浓度的ROX Reference Dye.

**qPCR 反应条件**

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	
5	65-95°C	系统默认	

1\*: 可选步骤, 使用2× F-qPCR Easy™ Mix (UNG)-SYBR时, 通过该步骤有效去除污染; 若使用2× F-qPCR Easy™ Mix-SYBR可跳过该步骤。



## 问题分析指南

以下针对斑马鱼直接 qPCR 系列试剂盒在斑马鱼直接 qPCR 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：

028-83361257 或 E-mail: [Tech@foregene.com](mailto: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，然后再进行实验。

#### 2. PCR 试剂保存不当失去活性。

建议：2x 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 程序进行实验。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. 引物浓度不合适。

建议：适当调整反应体系中引物的浓度。

#### 6. 引物设计问题。

建议：尝试重新设计引物进行检查。

### 实验重复性差

#### 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。

## 溶解曲线出现多峰

### 1. 退火温度偏低。

建议：使用三步法进行实验，并对退火温度做一个梯度摸索。

### 2. 引物浓度偏高。

建议：适量降低引物用量。通常引物终浓度为  $0.25\mu\text{M}$  可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在  $0.1\text{-}0.5\mu\text{M}$  范围内调整引物浓度。

### 3. 模板浓度太低或抑制物浓度过高。

建议：适当调整模板用量。

## 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. 样本及其裂解产物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，制备好的裂解产物尽快进行 qPCR 检测。

### 2. 裂解产物中抑制物过多。

建议：在 PCR 反应体系 5-10% 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 燃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](mailto:info@foregene.com)

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

