

Version 4

Code No. AG11731

2X 预混型探针法 qPCR 试剂盒 (适用于非洲猪瘟病毒检测, 含 UNG, 不含引物探针)

2X Premix Probe qPCR Kit for ASFV (UNG Plus, Primer Free)

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

➤ 产品概述

本产品是适用于探针法非洲猪瘟病毒 (ASFV) 检测的专用试剂，是一种 2X Premix 预混液，只需加入引物、探针、模板和水即可进行反应，操作非常简单。

本产品采用了反应性能优越的 *Accurate Taq HS* DNA 聚合酶，配合精心优化的 Buffer，可以进行高效稳定的 qPCR 扩增，非常适合非洲猪瘟等 DNA 病毒检测。

本产品中引入了 dUTP/UNG 防污染系统，在 PCR 反应过程中以 dUTP 取代 dTTP，利用 UNG 酶能选择性水解含 dU 的 DNA 链，而对不含 dU 的 DNA 链没有任何影响的特性，除去 PCR 反应体系配制过程中引入的含 dU 的污染模板，从而可有效防止 PCR 假阳性结果的产生；同时，本产品中还添加了在常温状态下能够抑制 DNA Polymerase 活性的单克隆抗体，能够有效抑制非特异性扩增，提高反应灵敏度，提升结果准确性。

➤ 产品组成

组分名称	AG11731 (400 rxns / 25 μl)
2X Probe Premix for ASFV (UNG Plus)	1 ml X 5 pcs

➤ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或-20℃冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品是一种 2X 预混液，反应液配制十分简单，仅需加入引物、模板、探针及水即可进行 qPCR 反应。
2. 本产品采用了性能优越的 *Accurate Taq HS* DNA 聚合酶及优化的反应体系，具有特异性强、扩增效率高的特性，非常适合非洲猪瘟等 DNA 病毒检测。
3. 本产品中引入了 dUTP/UNG 防污染系统，可除去含 dU 的 PCR 产物污染，从而有效防止出现 PCR 假阳性结果，提升实验结果的准确性。

➤ 实验原理

1. PCR 扩增原理

PCR 是一种 DNA 体外扩增技术，在模板 DNA、引物和脱氧核苷三磷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的聚合反应。将 DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”

三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内可获得大量目的基因片段。

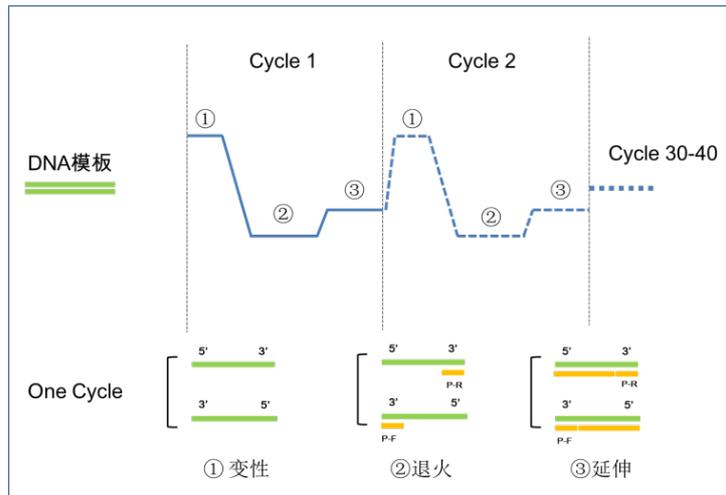
扩增详情如下图：

一般将步骤①②③称为一个循环，每次进行 DNA 扩增时以此循环 30 ~ 40 次。

步骤①：DNA 进行高温变性，DNA 双螺旋结构解链；

步骤②：引物与单链 DNA 进行退火；

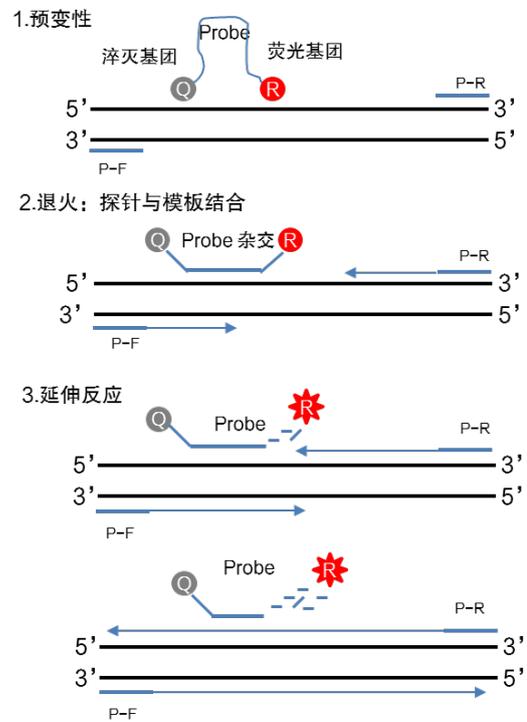
步骤③：引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸，与单链 DNA 形成互补链。



2. 荧光探针 qPCR 检测原理

荧光探针检测所用的探针在 5' 端标记有荧光物质（如：FAM），3' 端标记有淬灭物质（如：BHQ），当探针保持完整时，5' 端荧光基团发射的荧光受 3' 端淬灭基团淬灭，不能发出荧光信号；但是当探针被分解后，5' 端荧光基团与 3' 端淬灭基团分离，释放荧光信号。

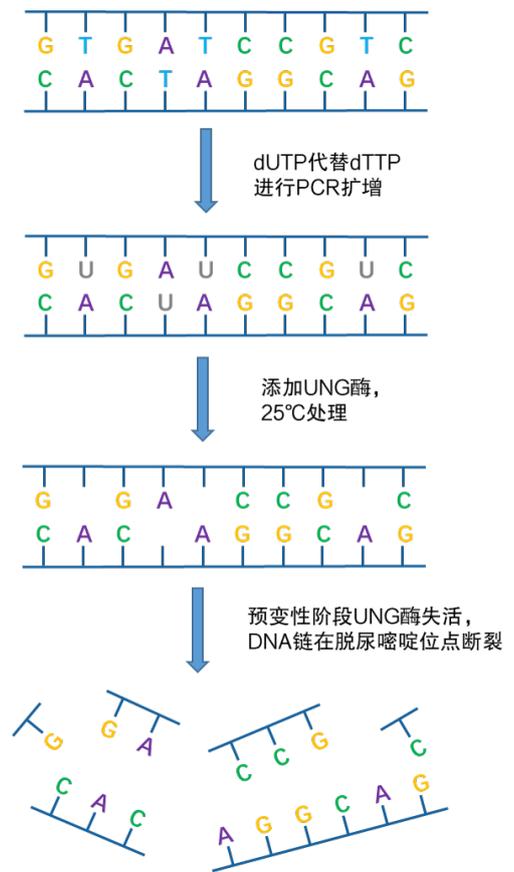
在 PCR 反应过程中，退火时荧光探针会与待检测模板杂交；延伸时，*Taq* DNA 聚合酶的 5' → 3' 外切酶活性可以分解杂交的探针，使得 5' 端荧光基团游离出来，进而释放荧光信号。通过检测反应体系中的荧光信号强度，达到对目的基因进行定量分析的目的。



3. dUTP/UNG 防污染系统作用原理

扩增产物所形成的气溶胶，是 PCR 反应中最主要的污染源之一。扩增产物中片段拷贝数大，即使极微量体积的气溶胶，其片段拷贝数也远远超过 PCR 检测下限，从而造成后续 PCR 反应的假阳性结果。由于气溶胶难以通过常规方法去除，因此 UNG 酶应运而生。

尿嘧啶-N-糖基化酶 (Uracil-N-glycosylase, UNG) 可以选择性水解双链或单链 DNA 中尿嘧啶脱氧核糖核苷酸 (dU) 中的尿嘧啶糖苷键。如果在 PCR 反应中用 dUTP 代替 dTTP，使 PCR 扩增产物都是带有 dU 的 DNA 链，并在后续 PCR 反应开始前增加 25°C 的恒温步骤，那么 PCR 体系中污染模板的尿嘧啶碱基会因 UNG 酶特异性切割 β-N 尿嘧啶糖苷键而从 DNA 链上脱离，产生脱嘧啶位点。当反应经过预变性阶段 95°C, 2 min 热处理后，DNA 污染模板在脱嘧啶位点处断裂，从而无法被扩增，避免了假阳性结果的产生，同时 UNG 酶被灭活，不再降解新产生的含有 dU 的 DNA 产物。



➤ 使用注意事项

1. 请仔细阅读所用定量 PCR 仪器设备操作手册，根据仪器操作手册进行操作。
2. 本产品中未配有 ROX Reference Dye，如果反应中需要添加 ROX Reference Dye 用以校正孔间荧光信号值误差，可选择如下产品配合使用：（请根据仪器设备说明书要求确定是否需要添加 ROX Reference Dye）
 - ROX Reference Dye (20 μM) (AG11703)
 - ROX Reference Dye (4 μM) (AG11710)
 注：上述 ROX Reference Dye 产品建议 50X 稀释使用（例如，50 μl 反应体系中添加 1 μl ROX Reference Dye），如果实验结果不理想，可调整 ROX Reference Dye 添加量。
3. 产品避免反复冻融，防止酶活降低；使用前可上下颠倒混匀或用移液器吸打混匀，请勿涡旋振荡混匀，防止酶活降低，同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。
4. 本产品中不含引物及探针。
5. 本产品于-20°C 保存条件下可能会产生沉淀，使用前可于冰上溶解或手握溶解，颠倒混匀至沉淀全部消失。请勿使用涡旋振荡。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材:

引物、探针、水 (RNase-free)、1.5 ml 离心管 (RNase-free)、定量 PCR 管 (RNase-free)、枪头 (RNase-free)、移液器。

2. 仪器:

	仪器
无需添加 ROX	(Bio-Rad) IQ5, CFX96™, CFX384™, CFX Connect™, MJOpticon, Opticon 2; (Cepheid) SmartCycler® System, Smart Cyclyer II System; (Roche) LightCycler® 2.0, 480, 96; (Qiagen) Rotor-Gene® Q, 3000, 6000; (Bioer) Line-Gene; (Eppendorf) Mastercycler ep realplex; (Analytik Jena) qTOWER3; (TaKaRa) Thermal Cycler Dice™ TP700, TP760, TP900, TP960, TP950, TP970, TP980, TP990;
添加 ROX (终浓度为 0.4 μM)	(Thermo) ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900 HT, 7900 HT Fast, StepOne, StepOnePlus;
添加 ROX (终浓度为 0.08 μM)	(Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™ 7, QuantStudio™ 3 / 5, QuantStudio™ 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™ Dx; (Agilent) Mx3000P™, Mx3005P™, MX4000™;

➤ 操作方法

(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems 为例)

1. 配制 PCR 反应液^{*1}

组分名称	反应终浓度	25 μl 体系
2X Probe Premix for ASFV (UNG Plus) ^{*2}	1X	12.5 μl
Primer F (50 μM)	0.2 μM ^{*3}	0.1 μl
Primer R (50 μM)	0.2 μM ^{*3}	0.1 μl
Probe (50 μM)	0.4 μM ^{*4}	0.2 μl
ROX Reference Dye (4 μM) ^{*5}	0.08 μM	0.5 μl
Template	-	≤ 100 ng ^{*6}
RNase free water	-	Up to 25 μl

- *1: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。
- *2: 该溶液要避免反复冻融, 防止酶活降低; 使用前可上下颠倒混匀或用移液器吸打混匀, 请勿涡旋振荡混匀。
- *3: 引物通常使用终浓度为 $0.2 \mu\text{M}$, 也可以在 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{M}$ 范围内调整。
- *4: 探针浓度与使用的定量 PCR 仪、荧光标记物质种类有关, 请参照仪器说明书及荧光探针的具体使用要求调整。探针通常使用终浓度为 $0.4 \mu\text{M}$, 可在 $0.1 \sim 0.8 \mu\text{M}$ 范围内进行调整。
- *5: 如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准, 请按照仪器推荐量添加。若不需要使用 ROX 进行荧光信号校准, ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。
- *6: 在 $25 \mu\text{l}$ 体系里, 模板添加量通常不高于 100 ng 。必要时可以进行梯度稀释, 以确定合适的模板添加量。

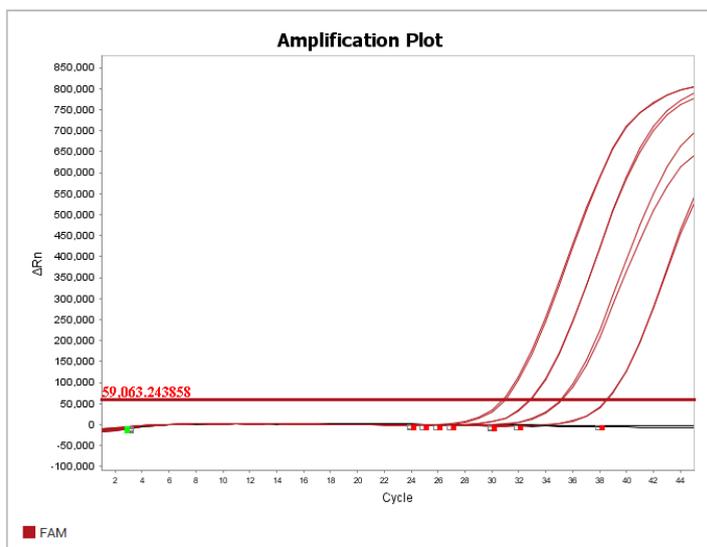
2. qPCR 反应条件^{*1、*2} (两步法 PCR 反应程序)

步骤	温度	时间	循环数
UNG 处理	25°C^{*3}	10 min^{*3}	1
预变性	95°C	30 sec^{*4}	1
变性	95°C	5 sec	45
退火和延伸	60°C^{*5}	30 sec^{*5}	

- *1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件。
- *2: 如果引物 T_m 值较低, 导致两步法扩增效率较差, 可采用三步法进行 PCR 扩增 (三步法 PCR 反应程序可参考附录)。
- *3: 建议在 25°C , 10 min 条件下进行 UNG 处理, 能够充分降解含 dU 的污染模板; 可根据实际需求在 $5 \sim 10 \text{ min}$ 范围内调整处理时间。
- *4: 预变性时间通常设定为 30 sec , 如果模板变性困难, 可以延长预变性时间至 $30 \text{ sec} \sim 5 \text{ min}$ 。
- *5: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增退火和延伸反应条件设定为 60°C 、 30 sec 时可以满足要求; 如需提高反应特异性, 可适当提高退火和延伸温度; 如需提高扩增效率, 或者 PCR 扩增产物较长, 则可将退火和延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增 (三步法 PCR 反应程序可参考附录)。

➤ 实验例

1. 以非洲猪瘟 B646L 标准物质 [GBW (E) 091034] 为模板, 使用本产品进行荧光探针 qPCR 方法检测 B646L 基因, $25 \mu\text{l}$ 反应体系中模板加入量为 3125 copies 、 625 copies 、 125 copies 、 25 copies 、 0 copies (阴性对照)。
所用定量仪器: ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems, 实验结果如下:



- 结果如上图所示：1、不同浓度的模板在 45 cycles 以内均能获得良好的扩增。
2、阴性对照在 40 cycles 内没有检出。

➤ 产品注意事项

1. 合适的模板加入量及浓度

- ❖ 模板量低：可能会导致扩增结果 Ct 值较大，荧光信号值较低，PCR 反应扩增效率较低，反应结果重复性较差。可适当提高模板量。
- ❖ 模板量高：可能会导致扩增结果 Ct 值较小、荧光信号值太高，扩增曲线异常。可适当降低模板量。
- ❖ 模板浓度高：模板取液量体积较小，可能会导致模板加样体积不准，实验重复性差。可将模板适当稀释后加样。

2. 高纯度及完整的模板

- ❖ 模板不纯：含有抑制 PCR 反应的物质，可能会导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。可重新纯化模板。
- ❖ 模板降解：可能会导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。可重新制备模板，重复实验。

3. 合适的引物浓度

- ❖ 引物浓度低：可能会导致反应效率低，扩增结果 Ct 值较大。可尝试提高 PCR 扩增引物浓度。
- ❖ 引物浓度高：可能会导致反应特异性不好。可适当降低引物浓度。
- ❖ 引物完整性不好：可能会导致无扩增曲线。可通过 PAGE 电泳确认引物的完整性，如引物有降解，建议更换引物。

❖ 引物设计的原则:

- ① 引物一般是 15 ~ 30 个碱基的寡核苷酸, GC 含量在 40 ~ 60 % 之间。
- ② 建议正反向引物 Tm 值在 50 ~ 70°C, 尽量减小两者的 Tm 值差, 并使差值不超过 5°C。
- ③ 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀, 避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
- ④ 引物 3' 端避免出现发夹结构。
- ⑤ 减少引物之间的互补序列, 一般不要超过 4 个碱基连续互补序列, 尤其是 3' 端, 否则可能会形成引物二聚体, 影响实验结果。

4. 合适的探针

- ❖ 探针浓度过高: 可能会导致背景值偏高; 若进行多重定量 PCR 检测, 易造成探针之间相互干扰。
- ❖ 探针浓度过低: 可能会导致扩增结果 Ct 值较大, 荧光信号值较低。
- ❖ 探针设计的原则:
 - ① 探针长度一般 18 ~ 40 bp。
 - ② 探针 5' 端尽量避免使用 G 碱基, 因其具有淬灭荧光的能力。C 碱基比 G 碱基多的探针效果更好, 如果 C 碱基数量少于 G 碱基数量, 可选择其互补链。
 - ③ 应避免探针中多个重复的碱基出现, 尤其是要避免 4 个及以上的 G 碱基出现。
 - ④ 探针的 Tm 值通常比扩增引物 Tm 值高 10°C, 一般控制在 65°C ~ 70°C 左右。
 - ⑤ 探针尽量靠近扩增引物, 但不可与之重叠。

5. 合适的退火温度

- ❖ 退火温度过低: 可能会导致反应特异性不好, 或形成引物二聚体。可适当提高退火温度。
- ❖ 退火温度过高: 可能会导致扩增效率低, 无扩增曲线。可适当降低退火温度。

6. 实验细节

- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡。
- ❖ 本产品于 -20°C 保存条件下可能会产生沉淀, 使用前确保完全溶解并混匀。
- ❖ 确认 ROX 浓度与仪器是否匹配, ROX 使用前确保完全融化并混匀。
- ❖ 检查反应程序, 确保反应程序设置正确。

➤ 附录：三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
UNG 处理	25°C	10 min	1
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	5 sec	45
退火	55°C	30 sec	
延伸	72°C	30 sec	