

***AccuLyo* Taq HS 预混型可冻干探针法  
qPCR 试剂盒（适用于 ASFV，  
含 UNG，不含引物探针）**

***AccuLyo* Taq HS Premix Probe qPCR  
Kit for ASFV (UNG Plus,  
Primer Free, Lyophilizable)**

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

本产品是一种含有冻干保护剂的 2X Premix 预混液，适用于探针法检测非洲猪瘟病毒（ASFV）。本产品可直接用于冻干品制备，也可以添加引物、探针后再进行冻干，冻干后的产品便于在室温条件下保存和运输。

本产品含有反应性能优越的 *Accurate Taq* HS DNA 聚合酶，配合精心优化的反应 Buffer，提高了 PCR 扩增性能及低浓度模板检测灵敏度，可以进行高灵敏度的 Real Time qPCR 反应，对靶基因进行准确定量检测。

本产品中还引入了 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                                                                       | AG11760<br>( 500 rxns / 20 $\mu$ l ) |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 2X <i>AccuLyo</i> Probe qPCR Mix for ASFV<br><br>( UNG Plus, Primer Free ) | 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. 本产品适用于探针法检测非洲猪瘟病毒（ASFV）。
2. 本产品是一款含冻干保护剂的 2X Premix 预混液，可直接用于冻干品制备，也可以添加引物、探针后再进行冻干，冻干后的产品便于在室温条件下保存和运输。
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。

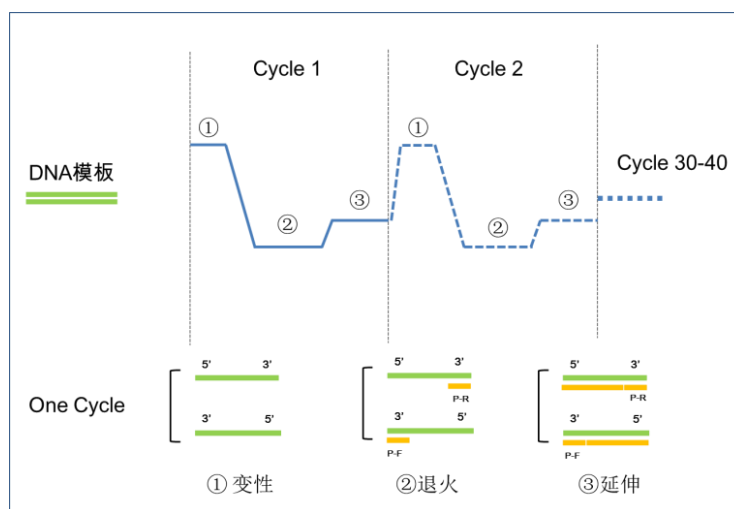
扩增详情如下图:

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;

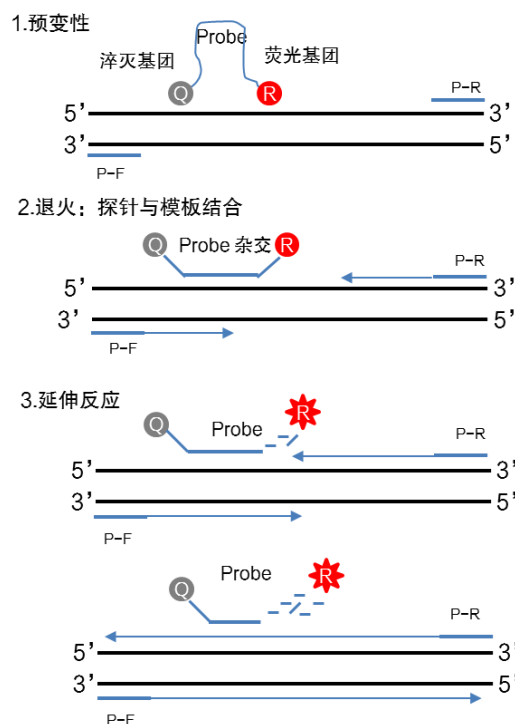
步骤③: 引物在 DNA 聚合酶的存在下进行延伸,与单链 DNA 形成互补链。



## 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。

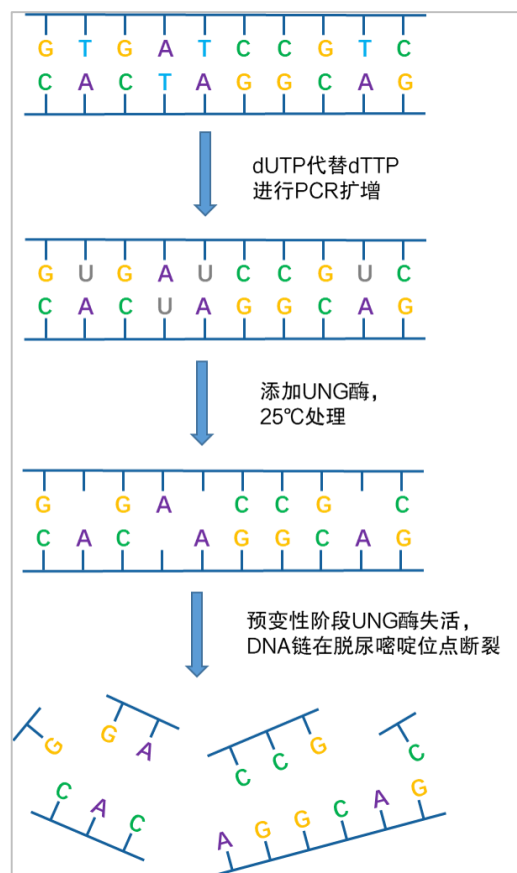
在 PCR 反应过程中, 退火时荧光探针会与待检测模板杂交; 延伸时, *Taq* DNA 聚合酶的 5' → 3' 外切酶活性可以分解杂交的探针, 使得 5' 端荧光基团游离出来, 进而释放荧光信号。通过检测反应体系中的荧光信号强度, 达到对目的基因进行定量分析的目的。



### 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℃ 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  $\beta$ -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。



### 4. 真空冷冻干燥原理

真空冷冻干燥的原理是在真空状态下，利用水的升华原理，使预先冻结的物料中的水分不经过冰的融化直接以冰态升华为水蒸汽被除去，从而使物料脱水获得冻干制品的过程。

真空冷冻干燥过程可分为预冻、升华干燥、解析干燥三个阶段。

预冻是为了固定产品，使物料温度迅速降低至其共晶点之下，为下阶段的升华做好准备。预冻与温度、时间有密不可分的关系，预冻条件控制不当会影响冻干品的成型和冻干质量。

升华干燥是冷冻干燥的主要过程，其目的是将物料中的水分通过升华而排出产品体外，整个过程中不允许冰出现溶化现象。

解析干燥就是要进一步降低冻干品的水分含量，该阶段的最高温度要根据产品性质和产品要求而定。为使冻干品最后的含水量进一步降低，可在规定的温度范围内适当提高解析干燥温度。

## ➤ 使用注意事项

1. 产品应避免反复冻融，防止酶活降低。
2. 本产品含有冻干保护剂，较为黏稠，在冰上融化后用移液器轻柔吸打混匀，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。
3. 本产品-20℃存放可能会产生沉淀，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。
4. 本产品中不含引物及探针。
5. 产品上机冻干前，需要确保管中液体均离心至底部。
6. 使用本产品直接进行冻干后，为避免冻干品受潮，冻干产品建议保存在密封袋中，并放入干燥剂；如同时混入引物、探针进行冻干时，冻干品还需要进行避光保存。

## ➤ 冻干流程

### 步骤一、冻干反应液配制

方法一：不含引物探针的可冻干预混液配制

在冰上将 2X *AccuLyo* Probe qPCR Mix for ASFV (UNG Plus, Primer Free) 充分融化，混匀后再使用，以 1 rxn (20 μl qPCR 反应体系) 为例，按照 10 μl/tube 进行分装。

| 组分名称                                                                            | 1 rxn <sup>*1</sup> |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2X <i>AccuLyo</i> Probe qPCR Mix for ASFV (UNG Plus, Primer Free) <sup>*2</sup> | 10 μl               |

\*1: 预混液分装体积可以根据 qPCR 反应需要进行调整。

\*2: 该 2X Premix 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。

方法二：含有引物探针的可冻干预混液配制

在冰上将 2X *AccuLyo* Probe qPCR Mix for ASFV (UNG Plus, Primer Free) 充分融化，混匀后再使用。以 1 rxn (20 μl qPCR 反应体系) 为例<sup>\*1</sup>。

| 组分名称                                                                            | PCR 反应终浓度 | 1 rxn <sup>*1,*2</sup> |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------|
| 2X <i>AccuLyo</i> Probe qPCR Mix for ASFV (UNG Plus, Primer Free) <sup>*3</sup> | 1 x       | 10 μl                  |
| Primer F (10 μM) <sup>*4</sup>                                                  | 0.2 μM    | 0.4 μl                 |
| Primer R (10 μM) <sup>*4</sup>                                                  | 0.2 μM    | 0.4 μl                 |
| Probe (10 μM) <sup>*5</sup>                                                     | 0.4 μM    | 0.8 μl                 |

\*1: 上述体系为 1 rxn 可冻干预混液配制方法，反应体系可以根据 qPCR 反应次数的需求进行调整，各

组分按比例变更即可。

- \*2: 为避免可冻干预混液中含水量过多导致冻干时长的增加, 建议不要补加 RNase free water; 在配制上述含引物探针的可冻干预混液中, 可冻干预混液的总体积建议控制在 20  $\mu$ l 以内。
- \*3: 该 2X Premix 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。
- \*4: 在 20  $\mu$ l 定量反应体系中, 引物通常使用终浓度为 0.2  $\mu$ M, 也可以在 0.1 – 1.0  $\mu$ M 范围内调整。
- \*5: 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。在 20  $\mu$ l 定量反应体系中, 探针终浓度可在 0.1 – 0.8  $\mu$ M 范围内进行调整。

## 步骤二、试剂混匀及冻干前准备工作

将上述“步骤一”配制好的预混液轻柔混匀, 并离心, 按照设定的分注体积分装于 96 well Plate 或者 8-Strip Tubes 中, 然后放置于冻干专用的 96-well 支架上。

## 步骤三、上机冻干

- 1) 上盖敞开, 将 96-well 支架放入冻干机中进行冻干;
- 2) 以 LABCONCO FreeZone® Triad™ 真空冷冻干燥机为例, 冻干条件及程序<sup>\*1</sup>可参考下表:

|      | 步骤 | 温度                     | 升降温速率<br>( $^{\circ}$ C/min) | 时间/(h) | 真空度 <sup>*2</sup> |
|------|----|------------------------|------------------------------|--------|-------------------|
| 预冻   | 1  | Max cold <sup>*3</sup> | 1.5                          | 2      | OFF               |
|      | 2  | -50 $^{\circ}$ C       | 1.5                          | 3      | OFF               |
| 升华   | 3  | -35 $^{\circ}$ C       | 1.5                          | 6      | 1 mbar            |
|      | 4  | -18 $^{\circ}$ C       | 1.5                          | 2      | 1 mbar            |
|      | 5  | 10 $^{\circ}$ C        | 1.5                          | 2      | 1 mbar            |
| 解析干燥 | 6  | 25 $^{\circ}$ C        | 1.5                          | 4      | 0.5 mbar          |

\*1: 具体冻干条件及程序需根据冷冻干燥机的性能、溶液体积进行调整, 上述冻干程序仅供参考。

\*2: 1 mbar=100 pa。

\*3: Max cold 为该真空冷冻干燥机的板层预冻温度, 温度 $\sim$ 75 $^{\circ}$ C。当采用-80 $^{\circ}$ C冰箱或者其他方式对待冻干预混进行预冻时, 该步骤 1 也可以省略。



#### 步骤四、下机包装

冻干完成后，尽快完成封盖，观察冻干品的形态；冻干品应有良好的物理形态，如外形饱满、表面平整、不萎缩、色泽均匀等，冻干形态可参见下图 1。如果冻干形态不好，可对冻干条件或者工艺进行调整。如果冻干形态良好，可将冻干品放入密封性良好的包装袋内，同时放入干燥剂，封口后可于室温保存待用。



图 1 冻干品形态

### ➤ 使用上述步骤中冻干品进行定量 PCR 检测

#### 步骤一、反应体系配制

配制下述“方法一或方法二”反应预混液时，建议先在冻干品中加入适量的 RNase free water 使冻干品完全溶解，然后使用移液器缓慢吸打或者桌面振荡器轻柔振荡混匀，短暂离心，最后加入反应所需的其它组分，混匀后上机检测，反应液配制如下：

方法一：冻干品中不含引物、探针时配制 PCR 反应液，以 1 rxn 为例

| 组分名称                    | PCR 反应终浓度   | 20 $\mu$ l 体系             |
|-------------------------|-------------|---------------------------|
| 冻干品                     | —           | 1 cake <sup>*1</sup>      |
| Primer F ( 10 $\mu$ M ) | 0.2 $\mu$ M | 0.4 $\mu$ l <sup>*2</sup> |
| Primer R ( 10 $\mu$ M ) | 0.2 $\mu$ M | 0.4 $\mu$ l <sup>*2</sup> |
| Probe ( 10 $\mu$ M )    | 0.4 $\mu$ M | 0.8 $\mu$ l <sup>*3</sup> |
| Template                | —           | <100 ng <sup>*4,*5</sup>  |
| RNase free water        | —           | Up to 20 $\mu$ l          |

\*1: 1 cake 是对应 10  $\mu$ l 2X *AccuLyse* Probe qPCR Mix for ASFV ( UNG Plus, Primer Free ) 的冻干品。

\*2: 在 20  $\mu$ l 反应体系中，引物通常使用终浓度为 0.2  $\mu$  M，也可以在 0.1 – 1.0  $\mu$  M 范围内调整。

\*3: 在 20  $\mu$ l 反应体系中，探针终浓度可在 0.1 – 0.8  $\mu$  M 范围内进行调整。

\*4: 在 20  $\mu$ l 反应体系中，DNA 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；如果使用本产品进行 cDNA 的定量 PCR 扩增，cDNA 原液使用体积不要超过定量 PCR 反应总体积的 10%。

\*5: 本产品灵敏度极高，20  $\mu$ l 反应体系中，建议将模板稀释后加入 2-5  $\mu$ l /样本，以提升实验的准确度及重复性。

方法二：冻干品中含引物、探针时配制 PCR 反应液，以 1 rxn 为例

| 组分名称             | 20 $\mu$ l 体系            |
|------------------|--------------------------|
| 冻干品              | 1 cake <sup>*1</sup>     |
| Template         | <100 ng <sup>*2,*3</sup> |
| RNase free water | Up to 20 $\mu$ l         |

\*1: 1 cake 是对应 10  $\mu$ l 2X AccuLyse Probe qPCR Mix for ASFV (UNG Plus, Primer Free)，引物和探针的预混液冻干后的冻干品。

\*2: 在 20  $\mu$ l 反应体系中，DNA 模板添加量通常在 100 ng 以下，必要时可以进行梯度稀释，以确定合适的模板添加量；如果使用本产品进行 cDNA 的定量 PCR 扩增，cDNA 原液使用体积不要超过定量 PCR 反应总体积的 10%。

\*3: 本产品灵敏度极高，20  $\mu$ l 反应体系中，建议将模板稀释后加入 2-5  $\mu$ l /样本，以提升实验的准确度及重复性。

## 步骤二、上机检测

qPCR 反应条件<sup>\*1</sup> ( 两步法 PCR 反应程序 )

| 步骤                  | 温度                 | 时间                   | 循环数 |
|---------------------|--------------------|----------------------|-----|
| UNG 处理              | 25°C <sup>*2</sup> | 10 min <sup>*2</sup> | 1   |
| 预变性                 | 95°C               | 30 sec <sup>*3</sup> | 1   |
| 变性                  | 95°C               | 5 sec                | 45  |
| 退火和延伸 <sup>*5</sup> | 60°C               | 30 sec <sup>*4</sup> |     |

\*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序，如果引物 Tm 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 )。

\*2: 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 ~ 10 min 范围内调整处理时间。

\*3: 预变性时间通常设定为 30 sec，如果模板变性困难，可以在 30 sec ~ 5 min 范围内延长预变性时间。



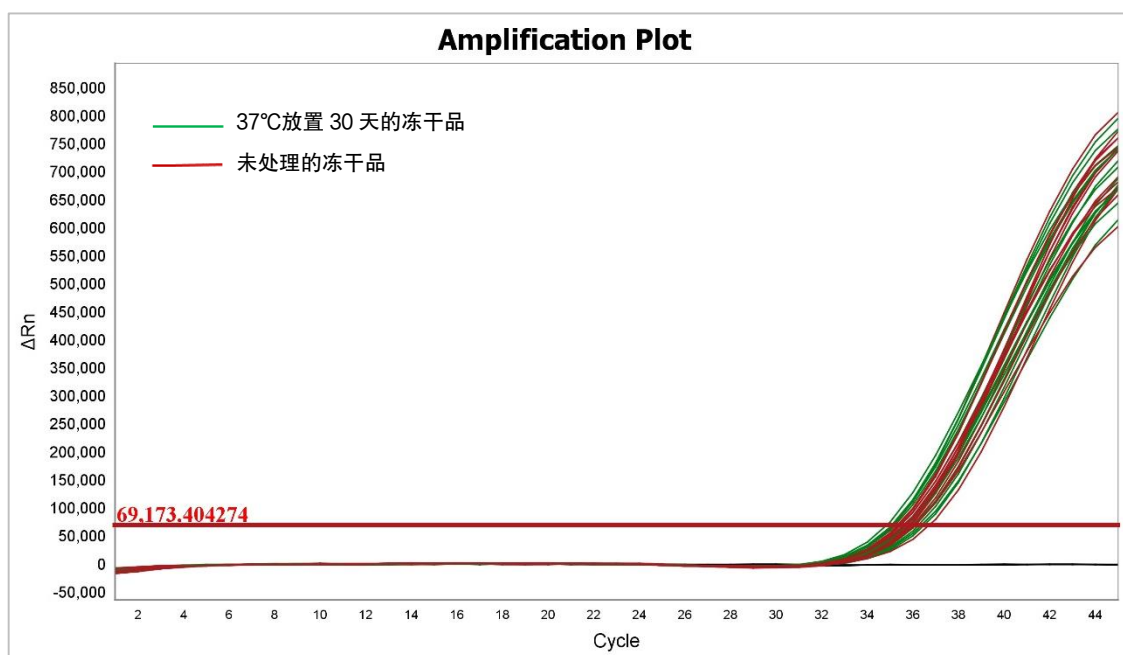
\*4: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增退火和延伸反应条件设定为 60°C、30 sec 时可以满足要求; 如需提高反应特异性, 可适当提高退火和延伸温度; 如需提高扩增效率, 或者 PCR 扩增产物较长, 则可将退火和延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增 (三步法 PCR 反应程序可参考附录)。

\*5: 此步骤进行荧光信号值采集。

## ➤ 实验例

以非洲猪瘟 B646L 标准物质 [ GBW ( E ) 091034 ] 为模板, 对在 37°C 放置 30 天的冻干品和未处理的冻干品同时进行荧光探针 qPCR 方法检测基因, 20  $\mu$ l 反应体系中模板加入量为 30 copies、0 copies (阴性对照)。37°C 放置 30 天的冻干品 (绿色曲线) 的性能和未处理的冻干品 (红色曲线) 的性能相当。

检测所用的定量仪器为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。检测的结果如下图所示:



结果如上图所示:

- 1、对于低拷贝的病毒模板, 37°C 放置 30 天的冻干品与未处理性能的检出率均为 100%, 性能相当。
- 2、阴性对照在 45 cycles 内没有检出。

## ➤ 产品注意事项

- ❖ 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。

- ❖ 当对 2X *AccuLyo* Probe qPCR Mix for ASFV ( UNG Plus, Primer Free ) 直接分装冻干时，需将试剂充分混匀后再准确分装。
- ❖ 当需添加引物探针进行冻干时，建议在分装和冻干过程中避免强光照射。
- ❖ 在分装可冻干预混时，如果管壁上沾有液体试剂，建议将管壁上的液体试剂离心至管底再进行冻干。
- ❖ 将本产品进行冻干时，可冻干预混中 2X *AccuLyo* Probe qPCR Mix for ASFV ( UNG Plus, Primer Free ) 的浓度范围要控制在 1X-2X。
- ❖ 将本产品进行冻干时，冻干品应有良好的物理形态，如外形饱满、表面平整、不萎缩、色泽均匀等。
- ❖ 如果冻干后的产品形态异常，应针对冻干条件或者工艺进行调整，如调整预冻温度与时间、升华干燥的温度、时间和真空度等。
- ❖ 冻干完成后建议在湿度较低的环境中快速完成封盖过程，防止冻干品受潮。
- ❖ 冻干品封盖后应尽快放入密封性较好的密封袋中，同时在密封袋中放入干燥剂。
- ❖ 对冻干品进行复溶后，应充分混匀后再上机。

## ➤ 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 <sup>*1</sup> | 72°C | 30 sec |     |

\*1：此步骤进行荧光信号值采集。