

荧光定量 PCR 仪性能评价试剂说明书

【产品名称】 荧光定量 PCR 仪性能评价试剂

【产品货号】 CR03S

【包装规格】 1 套

【产品介绍】 荧光定量 PCR 仪性能评价试剂由空白背景校准试剂、荧光染料校准试剂、 T_m 检测试剂和 PCR 仪性能确认试剂四个部分组成。其中空白背景校准试剂可考察各反应孔是否为正常背景信号，确保评估前仪器各反应孔无荧光污染；荧光染料校准试剂包含 FAM、HEX、ROX、Cy5 四种高浓度水溶性荧光染料，可稀释成不同浓度的工作液用于评估 PCR 仪荧光强度的重复性、均匀度、线性及各个通道间的荧光干扰情况； T_m 检测试剂由 T_m 引物样本混合液和 PCR 反应液（含 EvaGreen 荧光染料）组成，可用于评价荧光定量 PCR 仪的扩增曲线和熔解曲线一致性和孔间精密度等性能参数；PCR 仪性能确认试剂由标准品、阴性对照品、质控品和 PCR 反应液组成，用于确认荧光定量 PCR 仪的性能参数，包括线性回归相关系数（ r ）、灵敏度、扩增效率和定量准确度等。

【产品组分】

序号	名称	规格	数量
1	背景校准试剂	20mL/1 瓶	1 瓶
2	FAM 荧光染料	1mL*1 tube (10 μ M)	1 管
3	HEX 荧光染料	1mL*1 tube (10 μ M)	1 管
4	ROX 荧光染料	1mL*1 tube (10 μ M)	1 管
5	Cy5 荧光染料	1mL*1 tube (10 μ M)	1 管
6	荧光染料稀释液	20mL/1 瓶	1 瓶
7	2 \times Tm Premix A	1.25mL/tube	1 管
8	2 \times Tm Premix B	1.25mL/tube	1 管
9	2 \times PCR MIX	1mL/tube	1 管
10	标准品 1	0.1mL/tube	1 管
11	标准品 2	0.1mL/tube	1 管
12	标准品 3	0.1mL/tube	1 管
13	标准品 4	0.1mL/tube	1 管
14	标准品 5	0.1mL/tube	1 管

15	质控品 1	0.1mL/tube	1 管
16	质控品 2	0.1mL/tube	1 管
17	阴性对照	0.1mL/tube	1 管
18	石蜡油	8mL/1 瓶	1 瓶

【使用说明】

使用该产品时请认真阅读本说明书，以排除非变量因素引起的实验误差；试验前请准备好试验所需的配套设施和待测仪器，按照以下步骤顺序进行操作：

注意：以下操作过程中防止反应管（板）的底部吸附上荧光物质而产生异常的荧光背景信号。

1. 背景校准

- 1.1 取出背景校准试剂，平衡至室温。充分振荡混匀，并瞬时离心。
- 1.2 根据 PCR 仪的反应孔数，取 25 μ L 背景校准试剂加入 PCR 反应管（板）中，确保包含所有测试孔。
- 1.3 将 PCR 反应管（板）1500rpm 离心 2 分钟。
- 1.4 将 PCR 反应管（板）加载至 PCR 仪反应槽中，进行 PCR 测试，读取各反应孔的荧光强度。
- 1.5 参考程序

步骤	温度	时间	循环数
1	50 $^{\circ}$ C	2min	1
2	50 $^{\circ}$ C 采集信号	15sec	5

通道选择：1 通道；2 通道；3 通道；4 通道；

备注：根据不同仪器实际情况，可对检测程序进行调整。

- 1.6 查看所有反应孔的荧光值，如一个或多个孔出现荧光强度异常高或超出仪器荧光强度上限时（参考仪器说明书），按以下方法进行排查。
 - 1.6.1 将背景校准 PCR 管（板）旋转 180 $^{\circ}$ C 放置，然后再次执行校准程序。
 - 1.6.2 如异常孔位置不变，说明反应孔含荧光污染物，应根据设备说明书要求对污染的反应孔进行清洁；如异常孔随着位置调转，说明 PCR 管（板）受到污染，应丢弃并重新分装并校准。
- 1.7 空白背景校准通过后方可进行荧光染料校准。

2. 荧光染料校准

- 2.1 取出荧光染料、荧光染料稀释液和石蜡油，平衡至室温，充分振荡混匀并瞬时离心。
- 2.2 根据需要对荧光染料原液进行稀释，可分别测试仪器荧光强度的重复性、均匀度、线性及各个通道间的荧光干扰情况。荧光强度上限通常在 1 μ M-2 μ M，可根据不同设备进行调整，具体的稀释、测试

方法可参考国标（GB/T 42753-2023）。稀释好的染料加入 PCR 管（板）后应尽快使用，建议加入 20 μ L 石蜡油，防止染料蒸发。

2.3 将 PCR 反应管（板）1500rpm 离心 2 分钟。

2.4 参考程序

步骤	温度	时间	循环数
1	50 $^{\circ}$ C	2min	1
2	50 $^{\circ}$ C 采集信号	15sec	5
通道选择：1 通道；2 通道；3 通道；4 通道；			

备注：根据不同仪器实际情况及测试方法，可对检测程序进行调整。

2.5 检测结束后，分析实验结果。

2.6 计算方法：参考国标（GB/T 42753-2023）进行结果的计算及判定。

2.7 稀释好的荧光染料，2-8 $^{\circ}$ C 避光保存，7 天内可重复使用（但不超过 3 次）。

2.8 荧光染料校准通过后方可进行下一步检测（对于不进行 T_m 检测的用户可跳过 T_m 检测步骤，直接进入 4. PCR 仪性能确认步骤）。

3. T_m 检测

3.1 取出 2 \times T_m Premix A、2 \times T_m Premix B 和石蜡油，平衡至室温，充分混匀并瞬时离心。

3.2 按照下表顺序及取用量配制 T_m 反应液待测混匀液于适当容量容器中，充分混匀：

组分	取用量(μ L)
2 \times T_m Premix A	12.5 \times (n+y)
2 \times T_m Premix B	12.5 \times (n+y)

表中：12.5 表示对应组分终浓度为 1 \times 时的体积（25 μ L 体系）；

n—表示重复数量（n \geq 8）；y—表示预留损失数量。

3.3 反应液需充分混匀并分装 25 μ L /PCR 孔，每个 PCR 孔再加入 20 μ L 石蜡油封盖。

3.4 将 PCR 反应管（板）1500rpm 离心 2 分钟。

3.5 按照以下反应程序在待测 PCR 仪上用配套软件进行 T_m 测试，参考实验程序为：

步骤	温度	时间	循环数
1	95 $^{\circ}$ C	15sec	1
2	95 $^{\circ}$ C	5sec	50