

实时荧光定量 PCR 仪

一、仪器照片



二、仪器设备概况

1. 仪器简介：

Thermo Scientific Pikoreal 是一款小巧，快速，能同时进行多重 DNA 检测的实时荧光定量 PCR 系统。广泛用于科研，临床研究及诊断，食品检验，法医鉴定等领域。设计小巧，反应速度快，灵敏度高。具有绝对定量，相对定量，溶解曲线分析，等位基因检测分析功能，是一款性能优越，并能成倍节省实验成本的高性价比荧光定量 PCR 系统。

2. 性能参数：

1) PCR 模块

模块类型： 24 孔 or 96 孔

样品容量： 5 – 50 μl (24 孔), 5 – 20 μl (96 孔)

平均升温速率： $>5^{\circ}\text{C}/\text{sec}$

平均降温速率： $>4.5^{\circ}\text{C}/\text{sec}$

温控范围： 4 – 99.9°C

温度精确性： $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$

温度均一性： $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ (95 $^{\circ}\text{C}$ 时 1 秒内达到)

温度控制范围： 30 – 110°C

2) 光学检测系统

激发光源： 5 个 LED, 5 个激发光滤光片

激发波长范围： 475 – 640 nm

探测器： 5 个发射光滤光片, CCD

探测波长范围： 520 – 740 nm

预先校正染料： FAM, SYBR Green, HEX, Yakima Yellow, ROX, Texas Red, Cy 5

预先校正染料： 选配

线性范围： 10 个数量级

检测灵敏度： 单拷贝

3. 应用范围:

进行多重 DNA 检测的实时荧光定量 PCR 系统。广泛用于科研, 临床研究及诊断, 食品检验, 法医鉴定等领域

4. 面向学科

生物工程、制药工程

5. 联系人

任杰

6. 联系电话

63155

三、 仪器设备使用说明和操作规程

1) PCR 体系 (总体积 20 μ l) H₂O 适量 10 \times PCR buffer 2 μ l

dNTP mix (2.5mM) 2 μ l primer1(10pmol/ μ l) 2 μ l primer2(10pmol/ μ l) 2 μ l

Taq 酶 1-2U

Template 1 μ l (质粒 10ng 足够, 不要超过 1 μ g)

2) 加样顺序依上述体系从上至下顺序, 加模板时用带滤芯的枪头。操作时要加一次样, 将 EP 管在管架上移动一格。已加材料的管放在另外一个架子上, 这样可以预防重复加样或漏加样的错误。样品加完后盖上管盖, 轻弹管壁混匀, 瞬时离心。混匀也可用枪和带滤芯的枪头缓慢混匀。

3) PCR 反应条件

一般条件: 94 $^{\circ}$ C 5min-- (94 $^{\circ}$ C 30s 55 $^{\circ}$ C 30s 72 $^{\circ}$ C 30s-1min)20-30 次循环-- 72 $^{\circ}$ C 7min-- 4 $^{\circ}$ C 5min

如果按照上述条件没有得到应有产物, 那么可以采用梯度 PCR (T_m 可以从 40-70 $^{\circ}$ C) 摸索适当的退火温度、并适当延长退火温度。

① 变性温度与时间: 一般情况下, 93 $^{\circ}$ C~94 $^{\circ}$ C, 1min 足以使模板 DNA 变性, 若低于

93℃

则需延长时间，但温度不能过高，因为高温环境对酶的活性有影响。

② 退火(复性)温度与时间：退火温度是影响 PCR 特异性的较重要因素。退火温度与时间，取决于引物的长度、碱基组成及其浓度，还有靶基序列的长度。对于 20 个核苷酸，G+C 含量约 50% 的引物，55℃ 为选择最适退火温度的起点较为理想。引物的复性温度可通过以下公式帮助选择合适的温度：

$$T_m \text{ 值(解链温度)}=4(G+C)+2(A+T) \quad \text{复性温度}=T_m \text{ 值}-(5\sim 10^\circ\text{C})$$

复性时间一般为 30~60sec，足以使引物与模板之间完全结合。

③ 延伸温度与时间：Taq DNA 聚合酶的生物学活性：

70~80℃ 150 核苷酸/S/酶分子

70℃ 60 核苷酸/S/酶分子 55℃ 24 核苷酸/S/酶分子

高于 90℃ 时，DNA 合成几乎不能进行。

PCR 反应的延伸温度一般选择在 70~75℃ 之间，常用温度为 72℃，过高的延伸温度不利于引物和模板的结合。PCR 延伸反应的时间，可根据待扩增片段的长度而定，一般 1Kb 以内的 DNA 片段，延伸时间 30s 是足够的。3~4kb 的靶序列需 3~4min；扩增 10Kb 需延伸至 15min。对低浓度模板的扩增，延伸时间要稍长些。

④ 循环次数：循环次数决定 PCR 扩增程度。PCR 循环次数主要取决于模板 DNA 的浓度。一般的循环次数选在 30 次左右。如果产物要用于连接克隆，循环数最好在 15-20 次，模板可以适量增加。

4) 对照的设置

一般要求设置阳性和阴性对照。阳性用阳性模板作，阴性即为不加模板的反应体系。一般阳性体系的模板最后加。

四、仪器设备测试项目

多重 DNA 检测的实时荧光定量 PCR

五、仪器设备收费标准

设备仅对院内免费开放，耗材、试剂自备。