

EZ-Probe qPCR Master Mix 操作说明

Cat. No.: EZB-Probe

一、试剂盒简介

本试剂盒是采用探针法 qPCR 对基因进行定量检测的专用预混型试剂。本试剂盒的 2× EZ-Probe qPCR Master Mix 包含具有超强扩增能力和抗干扰能力的化学法热启动的 DNA 聚合酶和高度优化的缓冲液体系，极大地减少非特异性扩增。同时，试剂盒中引入了 dUTP/UDG 防污染系统，可消除扩增产物污染对 qPCR 的影响，保证结果的准确性。使用本产品进行 qPCR 反应，可以在宽广的定量区域内得到良好的扩增曲线，对目的基因的表达进行准确的定量检测，特异性、灵敏度高，重复性好，可信度高。

二、产品组分

组分	EZB-Probe (500 Rxns)	EZB-Probe-L (2,500 Rxns)
2× EZ-Probe qPCR Master Mix ¹	5 ml	25 ml
50× ROX Reference Dye 1 ²	220 µl	220 µl × 5 tubes
50× ROX Reference Dye 2 ²	220 µl	220 µl × 5 tubes

*1: 包含 UDG, dUTP/dTTP, 热启动 DNA 聚合酶和 buffer, 不包含引物和探针。

*2: 用于校正不同孔之间的荧光信号误差。

三、试剂保存条件

本试剂盒建议置于 -20°C 避光保存。

四、ROX 染料选择 (请根据仪器型号选用不同的 ROX)

Do Not Use ROX	Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; Roche LightCycler™ 96, Roche LightCycler™ 480; Eppendorf Mastercycler® ep realplex, realplex 2s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Thermo Scientific PikoReal Cyclor; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®.
Use ROX 1 (1×)	ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOne Plus™.
Use ROX 2 (1×)	ABI 7500, 7500 Fast, Quant-Studio 3, 5, 6, 7, 12K Flex, Dx, ViiA™7; Stratagene MX4000™, MX3000P™, MX3005P™.

五、简要操作步骤

1、使用前，将 2× EZ-Probe qPCR Master Mix 及 ROX 试剂从 -20°C 冰箱中取出，室温放置 5 ~ 10 分钟或用手紧握试剂管使之充分融化，上下颠倒 5 ~ 10 次使之充分混匀 (非常重要)，然后使用离心机短暂离心至管底，放在冰上备用。

2、逆转录反应得到的 cDNA 建议稀释并充分混匀后再作为模板使用，这样可以有效提高实验的重复性。通常建议稀释 5 ~ 10 倍后再使用 (具体的稀释倍数根据基因表达丰度来确定)；一般在 20 µl 的 qPCR 反应体系中：如果模板 cDNA 稀释 5 倍，建议使用 2 µl 的 cDNA (1 ~ 4 µl)；如果模板 cDNA 稀释 10 倍，建议使用 4 µl 的 cDNA (2 ~ 8 µl)；如果模板 cDNA 稀释 20 倍，建议使用 8.6 µl 的 cDNA；如果模板 cDNA 不稀释，建议使用 0.4 µl 的 cDNA (0.2 ~ 0.8 µl)。

假定模板 cDNA 在使用前已经用灭过菌的 ddH₂O 稀释了 5 倍 (20 µl cDNA 加 80 µl ddH₂O 稀释至 100 µl)，按照如下表格进行 qPCR 反应体系的配制：

成分	10 µl 体系	20 µl 体系
2× EZ-Probe qPCR Master Mix	5 µl	10 µl
Probe (10 µM)	0.1 µl	0.2 µl
正向引物 (10 µM)	0.2 µl	0.4 µl
反向引物 (10 µM)	0.2 µl	0.4 µl
ROX (50×, 根据仪器型号选择)	0.2 µl	0.4 µl
cDNA	1 µl (0.5 ~ 2 µl)	2 µl (1 ~ 4 µl)
ddH ₂ O (灭过菌)	补足到 10 µl	补足到 20 µl

备注：※关于探针浓度：探针终浓度与探针种类、荧光标记物质种类、使用的 Real Time PCR 扩增仪有关，实际使用时请参照各荧光探针的具体使用要求或仪器说明书进行；通常可以根据情况在 50 ~ 250 nM 之间调整；※关于引物浓度：通常引物终浓度为 0.2 µM，也可以根据情况在 0.1 ~ 1.0 µM 范围内调整引物终浓度。

3. qPCR 加样体系的配制：为了使加样误差降低到最低，一般建议将 cDNA 和 ddH₂O 配制成预混液，2× EZ-Probe qPCR Master Mix、Probe、引物对和 ROX 配制成预混液，分别混匀后再依次加入到每个反应孔中 (例如，对于 20 µl 的 qPCR 反应体系：每个反应孔中，cDNA 和 ddH₂O 的预混液加 8.6 µl，2× EZ-Probe qPCR Master Mix、Probe、引物对和 ROX 的预混液加 11.4 µl)；或者根据个人熟练掌握的加样方式进行加样。

4、加样完成后，盖上封板膜并封紧，用离心机 1000 rpm 离心 1 分钟，将液体离心至 qPCR 孔板底部。

5、qPCR 反应程序如下：

Step	1	2	3	
	污染消化	热启动酶活化	PCR 反应	
			循环数 (40 cycles)	
			解链	退火&延伸 (采集荧光信号)
温度	50°C	95°C	95°C	60°C
时间	2 min	5 min	10 sec	30 sec

注意：1、50°C 反应 2 分钟的目的是使 UDG 酶活化，UDG 酶可以在 PCR 反应前清除不慎污染的含 dUTP 的模板 cDNA，从而避免由于污染导致的假阳性结果；

2、95°C 反应 5 分钟的目的是活化热启动酶，此步骤为必须步骤，因此不能省略；3、在退火&延伸这一步骤需要进行荧光信号的采集；4、不需要跑熔解曲线。

六、关于 qPCR 反应是否良好的判断

1、如果扩增曲线呈典型的 S 型曲线，荧光背景信号阶段、荧光信号指数扩增阶段及平台期均完整可见，内参 Ct 值在合理范围内（通常可在 13~22 之间，典型的内参 Ct 值在 15~20 之间），则可认为该反应正常；

2、如果同一个模板和引物的重复孔数据 Ct 值相差 0.5 以内；

同时满足以上两个条件的可以认为数据可用。

七、关于探针的设计（建议优先设计探针，根据探针的情况设计引物）

1) 探针长度一般为 18~35 bp (18~30 bp 之间最好)；

2) 探针的位置：探针不能位于靠近基因 5'端或 3'端（因为引物需要位于探针的外侧）；

3) 选择能使探针中 C 碱基比 G 碱基多的序列作为模板序列；

4) 探针 5'端应避免使用碱基 G；

5) 探针序列中应避免连续相同的碱基出现，特别是避免 GGGG 或者更多的连续 G 出现；

6) 探针的 GC 含量为 20%~80%；

7) 对于单探针反应，探针的 Tm 为 65~70°C；

8) 如果序列中包含多态性位点，应使其位于探针序列中间。

八、关于 qPCR 引物的设计

1) 引物在探针序列确定好后再进行设计；

2) 正向引物或者反向引物应尽量接近探针序列，但不能和探针序列有重合区域；

3) 引物的最适长度为 17~25 bp；

4) 引物的 GC 含量为 20%~80%；

5) 引物序列中应避免连续相同的碱基出现，如果无法避免重复，则连续 G 碱基必须少于 4 个；

6) 引物的 Tm 值为 58~60°C；

7) 引物 3'末端最后 5 个碱基不能包含超过 2 个以上的 G 或者 C；

8) 使用 Blast 检索确认引物的特异性。

九、常见问题与解决方案

a. Ct 值太大：

1) 模板浓度太低：降低模板的稀释倍数，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起；

2) 模板降解：重新制备模板，重复实验；

3) 扩增效率低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计引物；

4) 反应体系中存在 PCR 反应抑制剂：一般为加入模板时带入，提高模板稀释倍数或者重新制备模板。

b. 实验重复性差：

1) 加样体积不准：使用性能较好的移液器；提高模板稀释倍数，以较大体积加入反应体系中；可以先将 Mix、水和引物按照需要的反应体系数量扩大 5%~10%，混合之后分至各反应管中，以减少误差；

2) 模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差。减少模板稀释倍数或提高加样体积；

3) 定量 PCR 仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。

c. 反应结束无扩增曲线出现：

1) 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段；三步法扩增程序应当将信号采集设置在延伸阶段；

2) 引物降解或污染：溶解的引物应分装成小份，-20°C 冻存，减少冻融次数，并防止污染；长时间未使用的引物应先通过 PAGE 电泳检测完整性，以排除降解的可能性；

3) 模板浓度太低：降低模板的稀释倍数，一般未知浓度的样品先从最高浓度开始做起；

4) 模板降解：重新制备模板，重复实验。

d. 扩增曲线形状异常：

1) 扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于 Ct 值，减少基线终点值 (Ct 值 - 4)，重新分析数据；

2) 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统矫正后产生。提高模板浓度重复实验；ROX 类型使用错误，确认所用 ROX 与机型是否匹配；

3) 个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡，由于温度升高后气泡破裂，使仪器检测到的荧光值突然降低所致；处理样本时要注意离心、进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

e. 阴性对照也出现明显扩增：

1) 反应体系或者水被污染：更换新的 Mix、引物和水；如有必要可在超净工作台内配制反应体系，减少气溶胶污染。