

# EZ-Probe qPCR Master Mix (ROX2 plus)操作说明

## Cat. No.: EZB-Probe-R2

### 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 (ROX2 plus)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。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-R2 (500 Rxns)	EZB-Probe-R2-L (2,500 Rxns)
2× EZ-Probe qPCR Master Mix (ROX2 plus) <sup>*1,2</sup>	5 ml	25 ml

\*1: 本试剂盒不含引物和探针；\*2: ROX2 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、适用的仪器型号 (如果仪器不在下表中, 请选用 EZB-Probe-R1)

ABI 7500, 7500 Fast, Quant-Studio 3, 5, 6, 7, 12K Flex, Dx, ViiA™7; Stratagene MX4000™, MX3000P™, MX3005P™.
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 Cyclers; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®.

### 五、简要操作步骤

1、使用前，将 2× EZ-Probe qPCR Master Mix (ROX2 plus)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 9 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 ddH<sub>2</sub>O 稀释了 5 倍 (20 µl cDNA 加 80 µl ddH<sub>2</sub>O 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 (ROX2 plus)	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
cDNA	1 µl (0.5~2 µl)	2 µl (1~4 µl)
ddH <sub>2</sub> O (灭过菌的)	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 ddH<sub>2</sub>O 配制成预混液，2× EZ-Probe qPCR Master Mix (ROX2 plus)、Probe 和引物对配制成预混液，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 ddH<sub>2</sub>O 的预混液加 9 µl，2× EZ-Probe qPCR Master Mix (ROX2 plus)、Probe 和引物对的预混液加 11 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	
	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	95°C	95°C	60°C
时间	5 min	10 sec	30 sec

**注意:** 1、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; 2、在退火&延伸这一步骤需要进行荧光信号的采集; 3、不需要跑溶解曲线。

## 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 T<sub>m</sub> 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 T<sub>m</sub> 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枪; 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;
- 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。