

EZ-Probe qPCR Master Mix-UDG (ROX1 plus) 操作说明

Cat. No.: EZB-Probe-U1

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-UDG (ROX1 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，极大地减少了非特异的扩增。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-U1 (500 Rxns)	EZB-Probe-U1-L (2,500 Rxns)
2× EZ-Probe qPCR Master Mix-UDG (ROX1 plus) ^{1,2}	5 ml	25 ml

*1: 本试剂盒不含引物和探针，包含 UDG、含有 dUTP/dTTP 的 dNTP 混合物、热启动 DNA 聚合酶、高度优化的缓冲液和 ROX1。

*2: ROX1 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

ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOne Plus™.
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 Cyler; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®.

五、简要操作步骤

1、使用前，将 2× EZ-Probe qPCR Master Mix-UDG (ROX1 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 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 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-UDG (ROX1 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 ₂ 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。※当基因组 DNA 为 qPCR 反应的模板时，对于 10 ~ 20 μl 的 qPCR 反应体系，建议基因组 DNA 的用量为 10 ~ 100 ng。

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-UDG (ROX1 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 ddH₂O 的预混液加 9 μl，2× EZ-Probe qPCR Master Mix-UDG (ROX1 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	3	
	UDG 孵育	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 分钟	5 分钟	10 秒	30 秒

注意: 1、50°C 反应 2 分钟的目的是使 UDG 在 PCR 反应前清除不慎污染的含 dUTP 的 DNA, 从而避免由于 DNA 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的 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 值为 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, 经系统校正后产生。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。