

1-Step Multiplex Probe RT-qPCR Kit (ROX2)

说明书

Cat. No.: EZ3204B-R2

一、产品简介

本试剂盒是以 RNA/DNA 为模板进行一步法探针法定量 PCR 检测的试剂盒。使用基因特异性引物 (GSP)，使逆转录和 qPCR 反应在同一个反应体系中完成，可在单次多通路反应中对多达四种不同的 RNA/DNA 靶标进行高灵敏度和高度重复性的检测。不需要额外的开管和移液，这大大提高了检测的通量、降低了检测的时间及污染的风险。

本试剂盒采用了高效的逆转录酶和热启动 DNA 聚合酶，预混液也采用了本公司专为诊断试剂领域开发的特殊优化的配方体系，使之具备了更强的扩增效率、特异性和抗干扰能力，检测灵敏度可达到 0.1 pg 总 RNA 或小于 10 拷贝的靶基因，并且可以在宽广的定量区域内得到良好的扩增曲线，对靶标进行准确的定量检测，重复性好，可信度高，十分便于使用。

二、产品组分

组分	货号 (规格)	EZ3204B-R21 (100 Rxns, 20 µl/Rxn)	EZ3204B-R22 (500 Rxns, 20 µl/Rxn)	EZ3204B-R23 (2,500 Rxns, 20 µl/Rxn)
10× MP RT-qPCR Enzyme Mix*1		200 µl	1 ml	5 ml
5× MP RT-qPCR Buffer (ROX2) *2		400 µl	2 ml	10 ml

注：*1. 含 M-MLV 突变体逆转录酶、热启动 DNA 聚合酶和 RNase Inhibitor; *2. 含 dNTPs、低浓度的 ROX2 及高度优化的缓冲液体系。

三、保存条件

本试剂盒于 -20°C 避光可保存 24 个月，过期日期详见产品标签中有效期信息。

四、适用的仪器型号 (如果仪器不在下表中，请使用 EZ3204B-R1)

ABI 7500, 7500 Fast, Quant-Studio 1, 3, 5, 6, 7, 12K Flex, Dx, ViiA™7; Aligent AriaMx, 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 Cycler; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®; Bioer Linegene 9600; HONGSHI SLAN®-96P.

五、注意事项

- 10× MP RT-qPCR Enzyme Mix 试剂含有高浓度的甘油，使用前请充分混匀后再短暂离心至管底。
- 反应液的配制请使用 RNase-free 或者灭过菌的吸头、EP 管等，尽量避免污染。

六、操作步骤

- 使用前，将试剂盒所有组分、Probe、引物对和 RNA/DNA 模板从冰箱中取出，冰上放置 5 ~ 10 min 或用手紧握试剂管使之充分融化，上下颠倒 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。
- 按照如下表格进行逆转录和 qPCR 反应体系的配制（为了使加样误差降低到最低，建议将 RNA/DNA 和 ddH₂O 配制成预混液，下表剩余组分配制成预混液，分别混匀后再依次加入到每个反应孔中）：

成分	10 μ l 体系	20 μ l 体系
RNA/DNA	40 ng (0.5 pg ~ 50 ng)	80 ng (1 pg ~ 100 ng)
10 \times MP RT-qPCR Enzyme Mix	1 μ l	2 μ l
5 \times MP RT-qPCR Buffer (ROX2)	2 μ l	4 μ l
Probe (10 μ M)	0.2 μ l	0.4 μ l
正向引物 (10 μ M)	0.4 μ l	0.8 μ l
反向引物 (10 μ M)	0.4 μ l	0.8 μ l
ddH ₂ O (灭过菌的)	补足到 10 μ l	补足到 20 μ l

备注：※关于探针浓度：存在多种探针的话，每种探针的终浓度可以在 50 ~ 250 nM 之间调整；※关于引物浓度：存在多对引物的话，通常每条引物终浓度为 0.4 μ M 即可得到较好的扩增效果，也可以根据情况在 0.1 ~ 1.0 μ M 范围内调整引物终浓度。

- 加样完成后，盖上封板膜并封紧，用离心机 1000 rpm 离心 1 min，将液体离心至 qPCR 孔板底部。
- 按照如下程序进行反应（建议打开仪器自带的探针法模板程序，并在此模板上根据下表进行调整）：

Step	1	2	3	
	逆转录反应	热启动酶活化	PCR 反应	
			循环数 (40 ~ 45 cycles)	
			解链	退火&延伸 (采集荧光信号)
温度	48°C	95°C	95°C	60°C
时间	5 min	5 min	10 sec	30 sec

注意：1. 对于具有复杂二级结构或高 GC 区域的模板，将逆转录温度提高到 55°C，有助于提高扩增效率和灵敏度；2. 95°C 反应 5 min 的目的是活化热启动酶，此步骤为必须步骤，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. 不需要跑熔解曲线程序。

七、关于 qPCR 反应是否良好的判断

- 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；
- 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。

八、qPCR 探针和引物的设计原则（建议优先设计探针，根据探针的情况设计引物）

序号	探针设计原则	引物设计原则
1	选择能使探针中 C 碱基比 G 碱基多的序列作为模板序列。	引物在探针序列确定后再进行设计。
2	探针的位置：探针不能紧邻基因序列的 5'端或 3'端（因为引物需位于探针的外侧）。	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	探针长度一般为 18 ~ 35 bp（18 ~ 30 bp 之间最佳）。	引物的最适长度为 17 ~ 25 bp。
4	探针 5'端应避免使用碱基 G。	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。
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。	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	探针的 GC 含量为 20% ~ 80%。	引物的 GC 含量为 20% ~ 80%。
7	对于单探针反应，探针的 Tm 为 65 ~ 70°C。	引物的 Tm 值为 58 ~ 60°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。	使用 Blast 检索确认引物的特异性。