

EZ-Probe Blood direct qPCR Kit (ROX1)

说明书

Cat. No.: B0020-R1

一、产品简介

本试剂盒适用于 EDTA、ACD 抗凝血液样本（包括抗凝全血、血清、血浆等，不适用于肝素抗凝血液样本），无需进行核酸提取步骤，仅需使用本试剂盒提供的专用裂解液 Buffer BL1 对血液样本进行简单处理，即可直接进行探针法 qPCR，用于基因含量、SNP 和转基因等的检测。检测结果与样本经过核酸提取得到的高纯度 DNA 产物的检测结果一致。

2× EZ-Probe qPCR Master Mix (ROX1) 是一种即用型混合液，含有热启动 DNA 聚合酶、dNTPs、高浓度的 ROX1 和高度优化的缓冲液体系。热启动 DNA 聚合酶和高度优化的缓冲液体系，使本产品具备了更强的扩增效率、特异性和抗干扰能力。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	货号（规格）	B0020-R11 (100 Rxns, 20 µl/Rxn)	B0020-R12 (500 Rxns, 20 µl/Rxn)	B0020-R13 (2500 Rxns, 20 µl/Rxn)
2× EZ-Probe qPCR Master Mix (ROX1) *1		1.1 ml	1.1 ml × 5	1.1 ml × 25
Buffer BL1		1.1 ml	5.5 ml	5.5 ml × 5

注：*1. 含 dNTPs、热启动 DNA 聚合酶、高浓度的 ROX1 及高度优化的缓冲液体系。

三、保存条件

本产品的所有组分建议置于 -20°C 避光保存，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 B0020-R2）

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 Cycler; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®; Bioer Linegene 9600; HONGSHI SLAN®-96P.

五、注意事项

- 2× EZ-Probe qPCR Master Mix (ROX1) 试剂含有高浓度的甘油，使用前请充分融化并充分混匀后再短暂离心至管底，然后置于冰上备用。
- 反应液的配制请使用灭过菌的吸头、EP 管等，尽量避免污染。

六、操作步骤

- 使用前，将 2× EZ-Probe qPCR Master Mix (ROX1)、Buffer BL1（裂解液）、探针和引物对从冰箱中取出，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，置于冰上备用。
- 样本预处理：
 - ① 向 200 μl EP 管中（或 96 孔 PCR 板）中加入 10 μl 裂解液。
 - ② 向裂解液中加入 20 μl 待测血液样本（抗凝全血、血清、血浆），盖紧盖子，涡旋振荡 10 sec 充分混匀，短暂离心至管底。（注意：裂解液和待测血液样本的体积可以根据情况按比例增加或减少。）
 - ③ 取上一步混匀的产物作为 qPCR 反应模板（Template DNA）。（注意：Template DNA 加入量可为 qPCR 反应体系总体积的 5%~20%，建议为 10%~15%。）
- 按照如下表格进行 qPCR 反应体系的配制（为了使加样误差降低到最低，建议将 Template 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 μl 体系	20 μl 体系
Template DNA	1 ~ 1.5 μl	2 ~ 3 μl
2× EZ-Probe qPCR Master Mix (ROX1)	5 μl	10 μl
探针 (10 μM)	0.2 μl	0.4 μl
正向引物 (10 μM)	0.4 μl	0.8 μl
反向引物 (10 μM)	0.4 μl	0.8 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：探针的终浓度可以在 50 ~ 250 nM 之间调整；※关于引物浓度：通常引物终浓度为 0.4 μM 即可得到较好的扩增效果，也可以根据情况在 0.1 ~ 1.0 μM 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	
	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	95°C	95°C	60°C
时间	5 min	10 sec	30 sec

注意：1. 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；2. 在退火&延伸这一步骤需要进行荧光信号的采集；3. 不需要跑熔解曲线程序。

七、关于 qPCR 反应是否良好的判断

- 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。
- 如果同一个模板和引物的重复孔的 Ct 值相差不超过 0.5。

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好后再进行设计。
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。

九、常见问题及解决方法

常见问题	可能的原因	解决方法
无扩增结果	血液样本存放时间过长或储存条件不当导致核酸降解	优先使用新鲜的血液样本, 或在 -20°C 或 -80°C 保存 (长期保存应置于 -80°C) 的血液样本, 样本保存时间过长或温度不符合要求可能会导致模板基因降解。
	使用了肝素抗凝血导致抑制 qPCR 反应	肝素的残留可能会抑制 qPCR 反应, 因此应该避免使用本试剂盒处理肝素抗凝血样本。
有扩增但扩增结果不理想	引物探针本身的扩增效率偏低	使用经过验证过的充分优化的引物、探针。
	样本因特殊原因导致对 qPCR 反应存在抑制性因素	减少 qPCR 的模板用量, 或者在处理样本前用 PBS 等比例稀释样本, 然后再加入裂解液进行处理, 以减少进入 qPCR 反应体系中的抑制因子的含量。