

Multiplex Probe qPCR Master Mix (ROX1)

说明书

Cat. No.: EZ3304-R1

一、产品简介

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，能够实现在单个反应孔中进行多重荧光定量 PCR。本试剂盒的 2× MP Probe qPCR Master Mix (ROX1) 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，可在单次多通路反应中对多达四种不同的靶标进行灵敏可重现检测。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)	EZ3304-R11 (100 Rxns, 20 µl/Rxn)	EZ3304-R12 (500 Rxns, 20 µl/Rxn)	EZ3304-R13 (2500 Rxns, 20 µl/Rxn)
2× MP Probe qPCR Master Mix (ROX1) *1	1 ml	5 ml	25 ml

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 EZ3304-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 Cyclyer; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®; Bioer Linegene 9600; HONGSHI SLAN®-96P.

五、操作步骤

- 使用前，将 2× MP Probe qPCR Master Mix (ROX1) 从 -20°C 冰箱中取出，室温放置 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。
- 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 4 µl 的 cDNA (1 ~ 8 µl)；如果模板 cDNA 稀释 10 倍，建议使用 8 µl 的 cDNA (4 ~ 10 µl)；如果模板 cDNA 不稀释，建议使用 1 µl 的 cDNA (0.4 ~ 2 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（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，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
2 $\times$ MP Probe qPCR Master Mix (ROX1)	5 μ l	10 μ l
Probe (10 μ M)	0.1 μ l	0.2 μ l
正向引物 (10 μ M)	0.2 μ l	0.4 μ l
反向引物 (10 μ M)	0.2 μ l	0.4 μ l
cDNA	2 μ l (0.5 ~ 4 μ l)	4 μ l (1 ~ 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 ~ 200 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 200 nM 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；※当基因组 DNA 为 qPCR 反应的模板时，对于 10 ~ 20 μ l 的 qPCR 反应体系，建议基因组 DNA 的用量为 10 ~ 100 ng。

3. 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。

4. qPCR 反应程序如下（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 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。

六、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 0.5 以内。

同时满足以上两个条件的可以认为数据可用。

七、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 T _m 为 65 ~ 70°C。	引物的 T _m 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。