

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

Cat. No.: EZB-Probe-R1

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 (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、试剂保存条件

本试剂盒建议置于-20°C 避光保存。

三、适用的仪器型号 (如果仪器不在下表中, 请选用 EZB-Probe-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®.

四、简要操作步骤

1、使用前, 将 2× EZ-Probe qPCR Master Mix (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 (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。

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 (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 (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	
	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、不需要跑熔解曲线。

五、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。

六、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 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。

七、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 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。

八、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。