

## Probe qPCR Master Mix

### 探针法荧光定量 PCR 试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL761A	探针法荧光定量PCR试剂盒	5 x 1ml

#### 产品简介:

本产品是专门用于探针法实时荧光定量的预混体系, 将热启动 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Mg<sup>2+</sup>、反应缓冲液和稳定剂等成分预混成即用的 2×Mix, 可对目标 cDNA 进行快速并具有高特异性的定量检测。相对于 SYBR 法, 探针法荧光定量的发光原理有所区别, 在目标样本低丰度的情况下有着更加稳定、准确的检测效果。本产品采用化学修饰的热启动 Taq 酶, 在 75℃ 以下没有活性, 激活需要 95℃ 孵育 10 min, 从而有效避免在低温条件下由引物和模板非特异性结合或引物二聚体而产生的非特异性扩增, 大大提高了 PCR 反应的灵敏度及特异性。2×浓度预混反应体系, 最大限度地减少人为误差、降低污染机率、节约实验操作时间, 快速简便、通用性广、灵敏度高、特异性强、稳定性好。

#### 产品组分:

产品编号	产品名称	规格
BL761A-1	2×Probe qPCR Mix	5 x 1ml
BL761A-2	ROX Reference Dye(25uM)	200ul

#### 保存条件:

收到本产品后, 请立即置于-20℃避光保存, 两年有效。从-20℃取出使用时, 将冻存的 Probe qPCR Mix 和 ROX Reference Dye 融解, 然后轻轻颠倒混匀, 待溶液完全均一后再行使用。如需一段时间内经常取用, 可在 2~8℃条件下储存 3 个月。避免反复多次冻融。

#### 使用说明:

##### 一、配制 Real-Time PCR 反应体系:

1、将所有试剂 2×Probe qPCR Mix, ROX Reference Dye, 模板, 引物, 探针和无酶水, 在室温下融解并彻底混匀, 避免产生气泡。短暂离心后, 置于冰上按照下表配制反应液。

参考下表配制反应体系:

组分	20 ul 体系	50 ul 体系
2×Probe qPCR Mix	10 μl	25 ul
Primer F (10 μM)*	0.5 μl	1 ul
Primer R (10 μM)*	0.5 μl	1 ul
探针*	0.5 ul	1 ul
cDNA 模板**	1 ul	1 ul
ROX Reference Dye***	0.4 ul	1 ul
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	补至 20 μl	补至 50ul

\* 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 uM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时, 可以在终浓度 0.2~0.4 uM 范围内调整引物浓度, 为获得理想的 qPCR 效果, 扩增片段的长度建议为 80-200bp。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.  
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



\*探针使用的浓度与使用的荧光定量 PCR 仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，具体添加的体积请参考仪器说明书或者荧光探针的具体使用要求进行调节。

\*\* 模板量：10-100 ng 基因组 DNA，或 1-10 ng cDNA 为参照，因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。另外，Two Step RT-PCR（两步法反转录）反应的 cDNA（RT 反应液）作为模板时的添加量不要超过 PCR 反应液总体积的 10%。

\*\*\* 不同仪器 ROX Reference Dye 推荐使用终浓度见下表：

仪器型号	ROX 用量 (50ul 体系)	ROX 终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/StepOne/ StepOne Plus 等	1 ul (0.6~1.0ul)	500nM (300~500nM)
ABI 7500/7500 Fast、QuantStudio® 3/5、QuantStudio 6/7 Flex、ViiA 7、Stratagene Mx3000P/Mx3005P和Mx4000等	0.1 ul (0.06~0.1 ul)	50nM (30~50nM)
Roche、Bio-Rad、Eppendorf 等	无需添加	

2、盖上或密封反应管/PCR 板，轻轻混匀。短暂离心，确保所有组分都在管/板底。

## 二、进行 Real-Time PCR 反应

1、建议采用两步法 PCR 反应程序进行反应。

两步法反应程序：

步骤	温度	持续时间	循环数
预变性	95°C	10 min	1
变性	95°C	15 sec	40
退火延伸	60°C	30 sec	40

若模板量较低等因素导致扩增效果不佳，或者对于超过 350 bp 或者高 GC 含量的扩增子，建议增加延伸时间至 60 s 或者采用三步法以提高扩增效率。

三步法反应程序：

步骤	温度	持续时间	循环数
预变性	95°C	10 min	1
变性	95°C	15 sec	40
退火	55-65°C	15-30 sec	40
延伸	72°C	30 sec	40

以上举例为常规 qPCR 反应系统，仅供参考。实际反应条件因模板、引物等的结构不同而有所差异，需根据模板、引物、目的片段的特点设定最佳反应条件，并根据比例放大或缩小反应体系。

2、上机检测：将反应体系置于荧光定量 PCR 仪中，运行程序收集数据并分析结果。



## 常见问题

### 1、无扩增信号或扩增曲线起峰晚或仅有引物二聚体

原因	解决办法
DNA 模板中存在抑制剂	重新纯化模板。
反应循环数不够	一般设置循环数 40，但过多的循环会增加背景信号，降低数据可信度。
PCR 条件、引物序列或浓度不当	请确认引物未发生降解，引物浓度及 PCR 条件。对于 GC 含量高的模板，可以适当延长变性时间。如果还是扩增不好，请重新设计引物。
起始模板问题	检查起始模板的浓度，保存条件和质量。重新对模板进行线性梯度稀释进行实验。增加起始模板使用量。
加样错误或试剂问题	检查试剂浓度和保存条件，包括所使用的引物和模板。重复进行实验。

### 2、阴性对照出现较高的荧光值

原因	解决办法
试剂污染	建议使用新试剂进行实验。
PCR 反应液配制时发生污染	采取必要的防污染策略（如使用带滤芯的枪头）。

### 3、出现引物二聚体和（或）非特异扩增

原因	解决办法
PCR 退火温度太低	建议每次增加 2°C 进行退火温度优化。
引物设计不合适	考虑重新设计引物序列。
PCR 产物太长	荧光定量 PCR 产物长度最好在 100-150 bp 之间，而且不应该超过 500 bp。
引物出现降解	可以使用变性聚丙烯酰胺胶检测引物降解情况。
计量误差	反应体积太小会导致检测精度下降。请根据定量 PCR 仪推荐的反应体积重新实验。

### 4、定量值重现性差

原因	解决办法
仪器方面的故障	因为仪器的不适用，在温度管理或检测时产生重现性差。请根据相应仪器的说明书进行点检。
样品纯度不好	不纯的样品会导致实验的重现性差。
稀释的模板放置太久	通过梯度稀释的模板最好现配现用。
引物质量下降	尽量避免新合成引物批次间的差异，可以使用原来质量好的引物做为对照。
PCR 反应条件、引物浓度、序列等不恰当	扩增效率差的 PCR 容易产生重现性差。通过变更引物的浓度或 PCR 反应条件来进行调整。扩增不好时，一般可降低退火温度或提高引物浓度，也可以延长延伸时间。如模板的 GC 含量较高，可延长变性时间。仍得不到改善时，建议重新设计引物。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.  
 注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



计量误差	反应体积太小会导检测精度下降。请根据定量 PCR 仪推荐的反应体积重新实验。
------	--

**注意事项:**

- 1、本产品可用于多重检测，但需要自行优化探针和引物，并建议进行预实验确定效果，一般建议不超过三重检测。
- 2、使用时请上下颠倒轻轻混匀，不要使用振荡器，尽量避免出现泡沫，短暂离心后使用。
- 3、引物纯度对反应特异性影响很大，建议使用 PAGE 级别以上纯化的引物。
- 4、反应液的配制、分装请一定使用无污染的枪头、PCR 管等，尽量避免交叉污染
- 5、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
- 6、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

