

产品概述

本产品是使用探针法进行qPCR的专用试剂。核心组分AceTaq DNA Polymerase是基于化学法修饰的热启动DNA聚合酶，配合针对qPCR优化的最适Buffer，可以有效抑制非特异扩增，从而显著提高扩增效率，适用于进行高灵敏度的qPCR反应。本产品是一种2×预混试剂，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量、检测，重复性好，可信度高。

产品组分

组分	Q112-02 (500 rxns/20 µl reaction)	Q112-03 (2,500 rxns/20 µl reaction)
2 × AceQ qPCR Probe Master Mix ^a	4 × 1.25 ml	
50 × ROX Reference Dye 1 ^b	200 µl	5 × Q112-02
50 × ROX Reference Dye 2 ^b	200 µl	

a. 包含dNTP, Mg²⁺, AceTaq DNA Polymerase等。

b. 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。不同机型ROX Reference Dye使用情况参见下表：

无需添加ROX Reference Dye	Bio-Rad CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ5, MyiQ, MiniOpticon, Opticon, Opticon 2, Chromo4; Cepheid SmartCycler; Eppendorf Mastercycler ep realplex, realplex 2 s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000; Roche Applied Science LightCycler 480; Thermo Scientific PikoReal Cycler.
添加ROX Reference Dye 1(终浓度为1 ×)	Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne, StepOnePlus.
添加ROX Reference Dye 2(终浓度为1 ×)	Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA7; Stratagene MX4000, MX3005P, MX3000P.

保存条件

-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。

适用范围

本试剂用于DNA样本的扩增定量，可以扩增所有物种来源的DNA，样本类型可以是基因组DNA、cDNA、质粒DNA、λDNA等。

注意事项

本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及非合理用途。

实验流程(以ABI StepOnePlus为测试机型)

1. 在qPCR管中配制如下混合液

2 × AceQ qPCR Probe Master Mix	10 µl
Primer1 (10 µM)	0.4 µl
Primer2 (10 µM)	0.4 µl
TaqMan Probe (10 µM)	0.2 µl
50 × ROX Reference Dye 1	0.4 µl
Template DNA/cDNA	x µl
ddH ₂ O	Up to 20 µl

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

▲ 一般来说反应体系中引物终浓度为0.2 µM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0.1 - 1.0 µM范围内调整引物浓度。

▲ 探针终浓度可以在50 - 250 nM之间调整。

▲ qPCR灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。

▲ 如模板类型为未稀释cDNA原液，使用体积不应超过qPCR反应总体积的1/10。

2. 按下列条件进行qPCR反应

Stage 1	预变性 ^a	Reps: 1	95℃	5 min
Stage 2	循环反应 ^b	Reps: 40	95℃	10 sec
			60℃	30 sec

a. AceTaq DNA Polymerase需要热激活处理以恢复酶活，请至少设置PCR反应预变性条件为95℃ 5 min。如果模板的GC含量较高，可将预变性时间延长至10 min。

b. 延伸时间请根据您使用的Real-time PCR仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用ABI 7700和7900HT时至少30 sec；使用ABI 7000和7300时至少31 sec；使用ABI 7500时至少34 sec；使用ABI StepOnePlus时至少10 sec。

引物设计指南

1. 引物长度17 - 25 bp为佳。太短的引物容易导致扩增效率降低；太长的引物会导致出现引物高级结构的几率增加。两者都会干扰定量结果的准确性。
2. 引物的GC含量控制在40% - 60%之间为好，最佳为45% - 55%之间。
3. 引物的Tm值应大于60℃，推荐使用Primer Premier 5进行Tm值计算。
4. 引物A、G、C、T整体分布尽量要均匀，避免使用GC或者TA含量高的区域，尤其是3'端，必须避开GC含量不均匀的区域。
5. 引物设计时请尽量避开T/C或者A/G的连续结构。
6. 引物3'端最后五个碱基不能包含超过2个以上的G或者C。
7. 正向或者反向引物应尽量接近探针序列，但是不能和探针序列有重合区域。

TaqMan探针设计指南

1. 探针序列应尽量接近正向或者反向引物，但是不能与之有重合区域。
2. 探针长度一般为18 - 40 bp。
3. 应避免连续相同的碱基出现，特别是要避免GGGG或者更多的连续G出现。
4. 探针5'端应避免使用碱基G。
5. 探针的退火温度应为65 ~ 67℃。
6. 如果序列中包含多态性位点，应使其位于探针序列中间。

常见问题与解决方案

◇ 扩增曲线形状异常

- ① 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；ROX类型使用错误，确认所用ROX与机型是否匹配。
- ② 扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于C_t值。减小基线终点(C_t值 - 4)，重新分析数据。
- ③ 个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡。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。

◇ 反应结束无扩增曲线出现

- ① 反应循环数不够：一般设置循环数为40，但需要注意的是过多的循环会增加过多的背景信号，降低数据可信度。
- ② 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72℃延伸阶段。
- ③ 确认引物是否降解：长时间未用的引物应先通过PAGE电泳检测完整性，以排除其降解的可能。
- ④ 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- ⑤ 模板降解：重新制备模板，重复实验。

◇ C_t值出现太晚

- ① 扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计合成引物。
- ② 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- ③ 模板降解：重新制备模板，重复实验。
- ④ PCR产物太长：推荐PCR产物长度为80 - 150 bp。
- ⑤ 体系中存在PCR抑制剂：一般为模板带入，加大模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验。

◇ 阴性对照出现明显扩增

- ① 反应体系污染：更换新的Mix、ddH₂O、引物重复实验。反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染。

◇ 绝对定量时标准曲线线性关系不佳

- ① 加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积。
- ② 标准品降解：重新制备标准品，重复实验。
- ③ 模板浓度太高：提高模板稀释倍数。

◇ 实验重复性差

- ① 加样体积失准：使用性能较好的移液枪；将模板做高倍稀释，以大体积加入反应体系中。
- ② 定量PCR仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。
- ③ 模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，减少模板稀释度或提高加样体积。