



0 2 5 - 8 5 6 5 3 5 2 5

[www.atgbiotechnology.com](http://www.atgbiotechnology.com)

南京市栖霞区江苏生命科技园 D 6 幢 710 室

# AllStart<sup>®</sup> qPCR U<sup>+</sup> Probe Master Mix

Q312



产品说明书  
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司  
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

## 目录 Product Manual

产品简介 .....	1
产品组成 .....	1
储存条件 .....	1
质量控制 .....	1
实验方案 .....	2
引物设计注意事项 .....	3
TAQMAN 探针设计指南 .....	3
常见问题与解决方案 .....	3

## 产品简介

本产品可用于探针法荧光定量 PCR，具有灵敏度高、特异性强、稳定性好、热启动快的优点。核心组分 AllStart® Taq DNA Polymerase 是基于适配体修饰的热启动 DNA 聚合酶，配合针对 TaqMan, Scorpions 和 Molecular Beacon (分子信标) 等探针检测技术优化的最适 Buffer，可以抑制非特异性扩增，从而显著提高扩增效率，适用于进行高灵敏度探针法 qPCR 检测反应。本试剂盒中引入了 dUTP/UDG 防污染系，热敏感 (Heat-labile) UDG 在室温下即可将含 U 的污染物速解，预变性时 Heat-labile UDG 迅速失活，不会影响 qPCR 的效率和灵敏度。本产品是一种 2 × 预混液，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。

## 产品组成

组 分	Q312 (500 rxn)	Q312 (2500 rxn)
2 × AllStart® qPCR U <sup>+</sup> Probe Master Mix <sup>a</sup>	5 ml	5 × Q312 (500 rxn)

a. 包含 dNTP, Mg<sup>2+</sup>, AllStart® Taq DNA Polymerase, UDG 酶等。使用 Applied Biosystems 的 Real Time PCR 仪等，需要进行孔间荧光信号校正时，ROX 添加量为终浓度 1 ×。

## 储存条件

-20°C保存，于-20 ~ 0°C运输。▲避免反复冻融。

## 质量控制

纯度检测：所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶、核酸残留。

功能检测：以国家标准 SARS-CoV-2 RNA 的逆转录产物稀释液为模板，扩增 3 个基因，扩增曲线在批次间的产品中相近。

## 实验流程

### 1.在 qPCR 管中配置如下混合液

组分	用量
2 × AllStart® qPCR U <sup>+</sup> Probe Master Mix	10 µl
Primer 1 (10 µM)	0.4 µl
Primer 2 (10 µM)	0.4 µl
TaqMan Probe (10 µM)	0.2 µl
Template DNA/cDNA	X µl
ddH <sub>2</sub> O	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 mM 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.按照以下条件进行 qPCR 反应

Stage 1	预变性* <sup>1</sup>	Reps: 1	95 °C	30 sec - 3 min
Stage 2	循环反应* <sup>2</sup>	Reps: 40	95 °C	3 - 10 sec
			60 °C	10 -30 sec

\*1. AllStart® Taq 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°C 30 sec。如果模板的 GC 含量较高，可将预变性时间延长至 5 min。

\*2. 延伸时间请根据您使用的 Real-time PCR 仪所需的数据采集最短时间自行调整：使用 ABI 7700 和 7900H 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 Step One Plus 时至少 10 sec。

## 引物设计注意事项

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 T<sub>m</sub> 值应大于 60 °C，推荐使用 Primer Premier 5 进行 T<sub>m</sub> 值计算。
4. 引物 A、G、C、T 整体分布应尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 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 5 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 bp - 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 °C。
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

扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统校正后产生。提高模板浓度重复性实验；ROX 类型使用错误，确认所用 ROX 与机型是否匹配。

扩增曲线断裂或者下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于 CT。减小基线终点 (CT 值-4)，重新分析数据。

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

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循环会导致过多背景信号，降低数据可信度。

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°C 延伸阶段。

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。

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。

模板降解：重新制备模板，重复实验。

### **CT 值出现太晚**

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。

模板浓度太低：减少稀释度重读实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。

模板降解：重新制备模板，重复实验。

PCR 产物太长：推荐 PCR 产物长度为 80-150 bp。

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**

反应体系污染：更换新的 mix、水、引物重复实验。反应体系在超净工作台内配置，减少气溶胶污染。

### **绝对定量时标准曲线线性关系不佳**

加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积。

标准品降解：重新制备标准品，重复实验。

模板浓度太高：提高模板稀释倍数。

### **实验重复性差**

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。

定量 PCR 仪不同的位置温度控制不一致：定期校准仪器。

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。