

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	
		100 RXN (20 μ L/RXN)	500 RXN (20 μ L/RXN)
Entrans Taq II DNA Polymerase (5,000 U/mL)	RM21208	20 μ L	100 μ L
4X qPCR Probe Buffer II (No dNTPs and Mg ²⁺)	RM21211	500 μ L	1.25 mL X 2
50X ROX Dye I	RM21465	44 μ L	220 μ L
50X ROX Dye II	RM21466	44 μ L	220 μ L
dNTPs (10 mM each)	RM20120	30 μ L	125 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	RM20144	1.25 mL	1.25 mL

产品说明

Entrans qPCR Probe Set V2 是基于探针法进行 qPCR 反应的专用试剂盒。本产品采用抗体化学双修饰热启动 Taq DNA 聚合酶进行扩增，在保证扩增效果的同时极大地提高了产品的特异性，同时具有定量准确、扩增效率高、重复性好和可信范围宽的特点。通过对 Buffer 体系的优化，使产品可以进行多重荧光定量试验，并且适用于多个物种，为多学科的实验需求提供了强有力的工具。

本试剂盒将反应 Buffer 中的 dNTPs 和 Mg²⁺ 拆分，方便用户进行体系优化。

保存温度

-20°C

适用机型

类型	仪器
无需添加 ROX 参比染料	Bio-Rad iCycler 系列, Roche Light Cycler 系列, Qiagen/Corbett 系列等
50X ROX Dye I (High Rox)	ABI 7000/7300/7700/7900, ABI StepOne/StepOnePlus 等
50X ROX Dye II (Low Rox)	ABI 7500, ABI ViiATM7, ABI Quanta Studio 系列, Strata gene 系列, Corbett Rotor Gene 3000 等

实验准备

1. EP 管、PCR 管、移液器、枪头、冰。
2. qPCR 引物、探针和相应模板。
3. 荧光定量 PCR 专用 tube 或平板及密封光学薄膜。

注意事项

1. 试剂在使用前请充分融解，在使用前请轻轻混匀，避免产生气泡；取用之前应混匀并离心。使用后请立即放回 -20°C 冰箱保存。
3. 本产品含有聚合酶，使用时请置于冰上，短时间内多次使用可在 4°C 暂存，应尽量避免反复冻融。
4. 使用时根据 qPCR 机型选择合适的参比染料。
5. 反应液配制和分装须使用无菌的枪头，推荐使用带滤芯枪头。
6. 为提高反应的成功率，建议使用高质量的 DNA 模板。

操作说明

实验前准备

1. 请确保引物设计的正确性和特异性。通常引物终浓度为 0.2 μ M 时可以得到较好的结果。扩增效果较差时，可以在 0.1-1.0 μ M 范围内调整引物浓度。
2. 扩增产物的长度建议在 70-200 bp 范围内。
3. 梯度稀释模板，并依次建立标准曲线。
4. 建议在 20 μ L 的体系中加入 1 pg-50 ng 的 DNA 为模板，并设计无模板对照。

5. 为确保实验结果的准确性, 建议每个样品和对照组重复 3 次。

推荐 PCR 反应

PCR 反应体系	
试剂	20 μ L
4X qPCR Probe Buffer II(No dNTPs and Mg ²⁺)	5 μ L
Entrans <i>Taq</i> II DNA Polymerase	0.1-0.2 μ L
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ L
dNTPs (10 mM each)	0.25 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	1.2 μ L
Probe (10 μ M)	0.4 μ L
50X ROX Dye (as required by instrument guidelines)	0.4 μ L
DNA Template	2 μ L (<50 ng)
Nuclease-free Water	to 20 μ L

注: 1. 室温融解 4X qPCR Probe Buffer II, 待完全融解后, 小心振荡混匀, 防止产生气泡, 最后瞬时离心。;

2. 计算实验所需 Mix 体积, 并预留足够的余量(一般余量要多于 10%)。

3. 在干净的 PCR 管或 EP 管内精确分取液体, 注意防止液体污染以及操作引起的误差。

4. 分别加入相应的引物、探针和模板, 待所有组分(无酶水、MIX 和 ROX)加入后, 小心振荡混匀, 最后瞬时离心。

5. 将配制的反应溶液转移到专用的 qPCR 板(管)内, 用配套的密封耗材密封(注意转移时不要引起气泡, 且液体尽量不要接触密封耗材)。

6. 2500 rpm 离心 qPCR 板(管) 2-3min, 准备上机。

推荐的 qPCR 反应程序如下			
步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}$ C	10 min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	15 s	
退火	60 $^{\circ}$ C	30 s	40

注: 1. 为确保延伸后进行信号采集, 延伸温度请根据引物探针 T_m 值自行调整。

2. 一般情况下预变性时间建议最短不得短于 3min, 最长不超过 10min; 循环反应中变性时间最短不短于 5s, 最长不超过 15s; 循环反应中延伸时间最短不短于 10s, 最长可根据自身所用引物探针及信号采集需要自行调整。

数据分析

1. 根据 Ct 值和投入样品的量绘制标准曲线。标准曲线相关系数 (R²) > 0.98, 标准曲线斜率介于 -3 至 -3.5 之间, qPCR 扩增效率 (E) 一般介于 90-120% 之间。

2. 重复管之间 Ct 值的 STD < 0.2, 不同批次间同一实验 Ct 值的 STD < 0.5(不同批次同一实验对比需保证阈值设置基本一致)。

3. 有效 Ct 值的确认: 有效的扩增 Ct 值应小于无模板的 Ct 值。

常见问题与解决方案

1) 扩增曲线形状异常

a. 扩增曲线不光滑: 信号太弱, 提高模板浓度并重复实验。

b. 个别扩增曲线骤降：反应管内有气泡，由于温度升高后气泡破裂，使仪器检测到的荧光信号突然降低所致。处理样本时要注意离心、加样过程中尽量避免出现气泡。

c. 扩增曲线上飘：仪器默认基线为 3-15 个循环的荧光值，可根据实际扩增情况调整基线。另外模板或引物降解可导致曲线上飘（必要时请进行电泳确认）。

2) 反应结束无扩增曲线

a. 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背景信号，降低数据可信度。

b. 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，以排除引物降解的可能性。

c. 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。

d. 模板浓度太低：减少稀释倍数并重复实验。

e. 模板降解：重新制备模板，重复实验。

f. 预变性时间不足：本产品采用抗体修饰热启动的 Taq DNA 聚合酶，请确保预变性时间设置为 3 min。

3) Ct 值出现太晚

a. 扩增效率极低：优化反应条件，重新设计引物。

b. 模板浓度太低：减少稀释倍数，重复实验。

c. 模板降解：重新制备模板，重复实验。

d. PCR 产物太长：一般设计扩增子长度为 70 -200 bp。

e. 反应体系中含有 PCR 抑制剂：一般由模板引入，加大模板稀释倍数或者重新制备模板。

f. 预变性时间不足：请确保预变性时间设置为 10 min。

4) 阴性对照也出现明显扩增

a. 反应体系或者水被污染：更换新的 Buffer 或水重复实验。反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染。

5) 重复性差

a. 加样体积失准：使用校准的移液器，增大微量试剂体积

b. 定量 PCR 仪器孔间温度不一致：定期校准仪器。

c. 模板浓度太低：减少模板稀释倍数或提高加样体积。

d. 阈值设置：对于不同板间的重复实验，请确保两次阈值设置一致。