

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-1
		50 RXN (20 μ L/RXN)	250 RXN (20 μ L/RXN)
Entrans 2X qPCR Probe Master Mix with UDG*	RM21214	500 μ L	1.25mL*2
50X ROX Dye I	RM21465	20 μ L	100 μ L
50X ROX Dye II	RM21466	20 μ L	100 μ L

*Contain hot-start Taq DNA Polymerase,UDG,Mg²⁺, dNTPs et. al.

产品说明

Entrans 2X qPCR Probe Master Mix with UDG 是基于探针法进行 qPCR 反应的专用试剂。本产品采用化学和抗体双重修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶进行扩增,在保证扩增效率的同时极大地提高了特异性,同时具有定量准确、重复性好和可信范围宽的特点,且加入了 UDG 防污染体系。通过对 Buffer 体系的优化,使产品可以进行多重荧光定量实验,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。

本产品为 2X 浓度预混液,除了引物、探针和模板外,包含了所有 qPCR 反应所需组分。

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。使用后立即放回 -20°C 冰箱保存。
2. 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。
3. 使用时根据 qPCR 机型选择合适的参比染料。
4. 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。
5. 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
Entrans 2X qPCR Probe Master Mix with UDG	10 μ L
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ L
Probe (10 μ M)	0.4 μ L
50X ROX Dye (as required by instrument guidelines)	0.4 μ L
DNA Template	4 μ L (<50 ng)
Nuclease-free Water	to 20 μ L

注: (1) 室温下溶解 Entrans 2X qPCR Probe Master Mix with UDG, 然后置于冰上备用, 待完全溶解后, 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
UDG 防污	37 $^{\circ}$ C	2 min	1
预变性	95 $^{\circ}$ C	3 min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	15 s	
退火	55 $^{\circ}$ 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得短于 5s, 最长不超过 15s; 循环反应中延伸时间最短不得短于 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

- 根据 C_t 值和投入样品的量绘制标准曲线。标准曲线相关系数 (R^2) > 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。
- 重复管之间 C_t 值的 STD < 0.2, 不同批次间同一实验 C_t 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)。
- 有效 C_t 值的确认: 有效的扩增 C_t 值应小于无模板的 C_t 值。

常见问题与解决方案

1) 扩增曲线形状异常

- 扩增曲线不光滑: 信号太弱, 提高模板浓度并重复实验。
- 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。
- 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)。

d. 平台期曲线上扬: Ct 值和重复性较好, 但平台期曲线上扬不平, 提高引物浓度并重复实验。

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: 本产品采用化学修饰热启动的 Taq DNA 聚合酶, 建议延长预变性时间, 可以将预变性时间延长为 10 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。

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上配制, 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。

相关产品推荐

产品名称	货号
ABScript III RT Master Mix for qPCR	RK20428
ABScript III RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover	RK20429
ABScript II cDNA First-Strand Synthesis Kit	RK20400
Entrans 2X qPCR Probe Master Mix	RK21208
Entrans qPCR Probe Kit	RK21209
Entrans qPCR Probe Set	RK21210
Entrans 2X qPCR Probe Master Mix with UDG	RK21222
ABScript III One Step RT-qPCR Probe Kit with UDG V5	RK20412
Fast One Step Probe RT-qPCR kit	RK20413