

## 产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2
		100 RXN(20 $\mu$ L/RXN)	500 RXN(20 $\mu$ L/RXN)
MethyLight HS Taq Polymerase	RM21231	100 $\mu$ L	500 $\mu$ L
MethyLight 5X qPCR Reaction Buffer	RM21234	400 $\mu$ L	1 mL*2

## 产品说明

MethyLight qPCR probe Kit 是基于探针法进行 MethyLight qPCR 反应的专用试剂盒。本产品采用抗体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶进行扩增, 通过对 Buffer 体系的优化, 使产品可以对亚硫酸氢盐转化法或酶转化法预处理后含有尿嘧啶的 ssDNA 进行多重 MSP (甲基化特异性 PCR) 分析, 在保证多重 MSP 扩增效率的同时极大地提高了甲基化与非甲基化序列的识别能力和灵敏度, 且具有定量准确、重复性好的特点。为表观遗传学研究中甲基化 DNA 的 MSP 分析和多靶标检测的实验需求提供了强有力的工具。

本产品为单酶和 5X 反应 buffer, 除了引物、探针和模板外, 包含了所有 MethyLight 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, ABI 7000/7300/7500/7700/7900, ABI StepOne/StepOnePlus, ABI ViiATM7, ABI QuantaStudio 系列, Stratagene 系列, Corbett Rotor Gene 3000, SLAN 系列, QuantGene 9600 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. MethyLight 5X qPCR Reaction Buffer 在使用前请充分融解。
2. MethyLight 5X qPCR Reaction Buffer 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。使用后应立即放回-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. 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。扩增效果较差时, 可以在 0.1-1.0  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ L
MethyLight 5X qPCR Reaction Buffer	4 $\mu$ L
MethyLight HS Taq Polymerase	1 $\mu$ L
Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
Probe (5 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
ssDNA Template	10 pg~100 ng
ddH <sub>2</sub> O	to 20 $\mu$ L

注: (1) 如反应体系需要更改为 25 $\mu$ L, 上述列表中所有反应溶液相应体积增加 1.25 倍即可。

(2) 计算实验所需体积, 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、探针和模板和 MIX 等组分, 待所有组分加入后, 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	5-10 min	1
循环反应	95 $^{\circ}$ C	15s	40~50
	55 $^{\circ}$ C	30 s	

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<sub>m</sub> 值自行调整。

2: 一般情况下预变性时间建议最短不得短于 5min, 一般不超过 10min, 最长不超过 20min; 循环反应中变性时间最短不短于 1s, 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

- 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 (R<sup>2</sup>) > 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 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)。
- 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

- 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)。

## 2) 反应结束无扩增曲线

- 反应循环数不够: 一般设置循环数为 40~50, 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。
- 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。

### 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 Mix 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。