

AceQ<sup>®</sup> qPCR

Probe Master Mix



**Vazyme Biotech Co., Ltd**

网站/Web: [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

咨询热线/Tel: 400-600-9335

销售/Sales: [sales@vazyme.com](mailto:sales@vazyme.com)

技术支持/Support: [support@vazyme.com](mailto:support@vazyme.com)

技术服务/Service: [service@vazyme.com](mailto:service@vazyme.com)



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

Vazyme biotech co., ltd.

---

**使用说明书**

Version 6.1

# 目录Catalog

产品概要

产品组成

贮藏与保质期

实验操作注意事项

参考实例

引物设计指南

TaqMan探针设计指南

常见问题与解决方案

qPCR反应有效性确认标准

## 1/产品概要

本产品是使用探针法进行qPCR的专用试剂。本产品基于热启动的AceTaq® DNA Polymerase, 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 × Mix预混合试剂, 使用方便。使用本产品进行qPCR反应, 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。

## 2/产品组成

组 分	Q112-01 (125 rxn/20 µl/rxn)	Q112-02 (500 rxn/20 µl/rxn)	Q112-03 (2,500 rxn/20 µl/rxn)
AceQ® qPCR			
Probe Master Mix <sup>a</sup>	1.25 ml	1.25 ml × 4	
50 X ROX Reference Dye 1 <sup>b</sup>	50 µl	200 µl	Q112-02 × 5
50 X ROX Reference Dye 2 <sup>b</sup>	50 µl	200 µl	

<sup>a</sup>包含AceTaq® DNA Polymerase, dNTP Mix, Mg<sup>2+</sup>。

<sup>b</sup>用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。使用ABI 7900HT/ 7300 Real-Time PCR System和StepOne Plus®时使用50 X ROX Reference Dye 1; ABI 7500, 7500 Fast Real-Time PCR System, Stratagene Mx3000P使用50 X ROX Reference Dye 2; Roche, Bio-Rad的Real Time PCR仪时不必使用ROX。

## 3/贮藏与保质期

本产品应置于-20℃储存; 使用过程中请尽量避免反复冻融。如每次使用量较少, 推荐小份分装使用

## 4/实验操作注意事项（请务必仔细阅读）

- 1) 本品尽量避免反复冻融，以免酶活下降。如每次使用量较少，推荐小份分装使用。
- 2) 使用前请上下颠倒以混匀Mix，请勿vortex以免产生过多气泡引起反应体系体积失准，进而影响定量结果。Mix经混匀后轻微离心后即可使用。使用过程中吹打要轻，如果操作不慎Mix起泡，需再次离心方可使用。
- 3) 由于本品检测灵敏度极高，因此即使空气中微小的气溶胶都可以引起污染，进而导致实验失败，因此反应体系配制时请于超净工作台内进行，配制过程中请使用干净灭菌枪头、反应管，条件容许的实验室推荐使用专用的取液枪，避免污染。推荐使用带滤芯的枪头。

## 5/参考实例

使用AceQ® qPCR Probe Master Mix或者Q公司提供的qPCR预混液结合ROX参考染料，对人GAPDH基因进行实时定量PCR测定，模板使用10倍系列稀释Hela基因组DNA (10<sup>4</sup>到10个拷贝)。测试机型ABI StepOne Plus®。

注意：实际应用过程中请每个浓度梯度至少设置3个重复反应(定量结果统计学分析要求至少三个重复才具有统计意义)。

### 1) qPCR反应体系配制

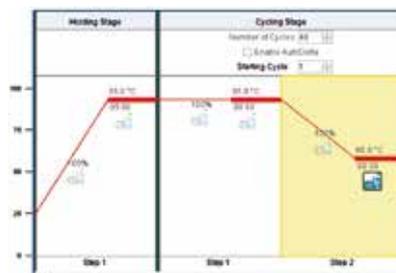
AceQ® qPCR Probe Master Mix	10	μl
Primer 1 (10 μM)	0.4	μl
Primer 2 (10 μM)	0.4	μl
TaqMan Probe (10 μM)	0.2	μl
ROX Reference Dye 1	0.4	μl
模板DNA	x	μl
灭菌蒸馏水	Up to 20	μl

注：反应体系中各成分的量可根据一下原则自行调整：

- I. 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0.1-1.0 μM范围内调整引物浓度。
- II. 探针终浓度可以在50 nM-250 nM之间调整
- III. 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。因此如仪器允许，推荐您使用50 μl反应体系,并且将模板稀释后(如稀释至5 μl/样本)加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。
- IV. cDNA模板的体积不要超过反应体积的1/10。

### 2) qPCR反应程序设置

一般采用下图所示两步法程序进行反应，即退火/延伸设置在60°C。也可以用三步法进行定量反应。注意：AceQ® 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 5分钟。如果模板的GC含量较高，可将预变性时间延长至10分钟。

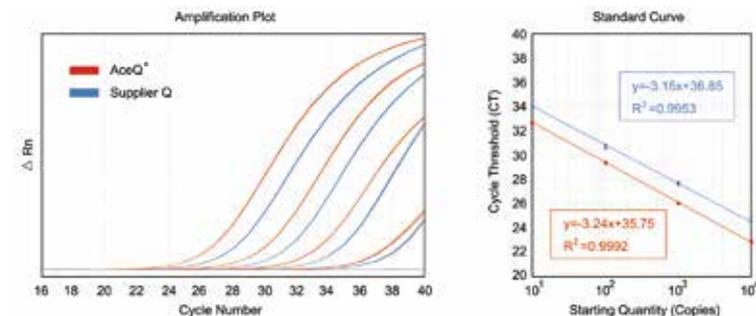


两步法标准程序：

Stage1 预变性	Reps: 1	95°C	5	min
Stage2 循环反应	Reps: 40	95°C 60°C	10 30*	sec

\*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秒；使用ABI 7000和7300时至少31秒；使用ABI 7500时至少34秒；使用ABI StepOne Plus® 时至少10秒。

- 3) 反应结束后确认qPCR的扩增曲线(图一左)，进行标准曲线制作(图一右)等。PCR扩增产物特异与否也可用琼脂糖凝胶电泳进行确认。



使用AceQ® qPCR Probe Master Mix(红色线) 或者Q公司提供的定量PCR预混液(蓝色线) 结合ROX参考染料，对人GAPDH基因进行qPCR测定。Amplification Plot显示AceQ® qPCR Probe Master Mix 具有更强的扩增能力和更低的检测下限(左)，且检测范围内线性关系良好(右)。

## 6/引物设计指南

- 1) 引物长度17 bp-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。
- 4) 引物设计时请尽量避免T/C或者A/G的连续结构。
- 5) 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。
- 6) 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。

## 7/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°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。

## 8/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，经系统矫正后产生，提高模板浓度重复试验。
- b). 扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于Ct值。减小基线终点(Ct值-4)，重新分析数据。
- c). 个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡，由于温度升高后气泡破裂，使仪器检测到的荧光值突然降低所致。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。

### 2). 反应结束后无扩增曲线出现

- 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过多的背景信号，降低数据可信度。
- b). 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两部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。
- c). 确认探针/引物是否降解：长时间未用的探针/引物应先通过PAGE电泳检测完整性，以排除其降解的可能性。
- d). 模板浓度太低：减少稀释度重复试验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- e). 模板降解：重新制备模板，重复试验。

### 3). Ct值出现太晚

- a). 扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计引物
- b). 模板浓度太低：减少稀释度重复试验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- c). 模板降解：重新制备模板，重复试验。
- d). PCR产物太长：一般将PCR产物长度设计为100 bp-150 bp之内。
- e). 反应体系中存在PCR反应抑制剂：一般为加入模板时带入，加大模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验。

### 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或者水重复试验。反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染。
- b). 引物二聚体的出现：一般在35循环以后阴性对照出现扩增属正常情况。

### 5). 绝对定量时标准曲线线性关系不佳

- a). 加样误差：加大模板稀释倍数，提高加样体积。
- b). 标准品降解：重新制备标准品，重复试验。
- c). 模板浓度太高：增加模板稀释倍数。

### 6). 实验重复性差

- a). 加样体积失准：使用性能较好的移液枪，扩大反应体积，将模板做高倍稀释，以大体积加入反应体系中。
- b). 定量PCR仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。
- c). 模板浓度太低：模板浓度越稀，重复性越差，减少模板稀释度活提高加样体积。

### 7). 本产品是否可以4°C储存

- a). 不可以。4°C保存将会导致产品活性下降。
- b). 该产品-20°C保存可以长期保持活性，推荐-20°C保存。
- c). 因反复冻融也可能导致产品活性下降，因此当每次用量较小时，推荐小体积分装后-20°C保存。

### 8). 预变性时间

本产品基于的AceTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase是化学修饰的热启动Taq酶，需要设置预变性温度为95°C，时间为至少5分钟，以充分释放酶活。如果模板的GC含量很高，可将预变性时间延长至10分钟。

## 9/探针法qPCR反应有效性确认标准

### 1). 线性关系以及扩增效率确认：

标准曲线相关系数(R<sup>2</sup>)>0.98

标准曲线斜率介于 -3~-3.5之间

PCR扩增效率(E)介于 0.9~1.2之间

### 2). 重复性确认：

重复管之间的STD<0.2