

产品简介

AceQ® U+ Probe Master Mix是使用DNA为模板进行探针法荧光定量PCR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探针法qPCR反应。试剂中引入了dUTP/UDG防污染系统。Heat-labile UDG在室温下即可将含U的污染物迅速降解, 完全消除了扩增产物污染对qPCR反应的影响。本产品是一种2 × 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。

产品组成

组 分	Q113-01 125 rxn (20 µl/rxn)	Q113-02 500 rxn (20 µl/rxn)	Q113-03 2,500 rxn (20 µl/rxn)
2 × AceQ U+ Probe Master Mix ^a	1.25 ml	1.25 ml × 4	
50 × ROX Reference Dye 1 ^b	50 µl	200 µl	Q113-02 × 5
50 × ROX Reference Dye 2 ^b	50 µl	200 µl	
a. 包含dNTP/dUTP Mix, Mg ²⁺ , AceTaq® DNA Polymerase, Heat-labile UDG.			
b. 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。不同机型Rox Reference Dye 使用情况参见下表:			
无需添加Rox Reference Dye	Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; Cepheid SmartCycler®; Eppendorf Mastercycler® ep realplex, realplex 2 s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Roche Applied Science LightCycler™ 480; Thermo Scientific PikoReal Cycler;		
添加Rox Reference Dye 1 (终浓度为1 ×)	Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOnePlus™;		
添加Rox Reference Dye 2 (终浓度为1 ×)	Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA™7; Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™.		

储存条件

本产品应置于-20℃储存, 有效期一年。

质量控制

所有组分经检测均无核酸外切酶, 核酸内切酶残留。

功能测试: 以100 ng HeLa细胞总RNA逆转录产物的数十倍稀释梯度为模板, 扩增B2M基因。扩增效率在0.95-1.05之间, 10⁻⁵稀释梯度Ct值不大于35。

应用实例 (以ABI StepOnePlus™为测试机型)

1. 在qPCR管中配制如下混合液

2 × AceQ U+ Probe Master Mix	10 µl
Primer1 (10 µM)	0.4 µl
Primer2 (10 µM)	0.4 µl
TaqMan Probe (10 µM)	0.2 µl
50 × ROX Reference Dye 1	0.4 µl
Template DNA/cDNA	x µl
ddH ₂ O	Up to 20 µl

注: 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0.1-1.0 µM范围内调整引物浓度。
- 探针终浓度可以在50 nM-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 (如稀释至2-5 µl/样本) 加入反应体系中, 这样可以有效提高实验的重复性。
- 扩增产物长度请选择在80 bp-200 bp范围内。
- 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. 按下列条件进行qPCR反应

Stage 1	污染消化	Reps: 1	37 °C	2 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95 °C	5 - 10 min
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95 °C	10 sec
			60 °C*	30 sec

* 延伸时间请根据您的使用qPCR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。

实验操作注意事项

- 1)本产品基于的AceTaq® 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。如模板的GC含量很高，可将预变性时间延长至10分钟。
- 2)使用本品前请上下颠倒充分混匀并短暂离心。如果操作不慎Mix起泡，需再次离心后使用。

引物设计注意事项

- 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)引物的Tm值应大于60°C，推荐使用Primer Premier 5进行Tm值计算。
- 4)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。
- 5)引物设计时请尽量避免T/C或者A/G的连续结构。
- 6)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。
- 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探针设计注意事项

- 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。

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；ROX类型使用错误，确认所用ROX与机型是否匹配。
- 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) 反应结束无扩增曲线出现

- a)反应循环数不够：一般设置循环数为45，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，或者重新设计引物探针
- 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：推荐将PCR产物长度设计为80 bp-200 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)非特异性扩增的出现：一般在40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。

探针法qPCR数据有效性判定标准

- 1)线性关系以及扩增效率确认：标准曲线相关系数(R^2) > 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