

● 常见问题及解决方案

1) 扩增曲线形状异常

- ❖ 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统校正后产生，提高模板浓度重复试验。
- ❖ 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

- ❖ 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。
- ❖ 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℃延伸阶段。
- ❖ 确认引物/探针是否降解：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。
- ❖ 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。
- ❖ 模板降解：重新制备模板，重复试验。

3) Ct 值出现太晚

- ❖ 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。
- ❖ 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。
- ❖ 模板降解：重新制备模板，重复试验。
- ❖ PCR 产物太长：一般将 PCR 产物长度设计为100 bp-150 bp 之内。
- ❖ 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。

● 探针法 qPCR 反应有效性确认标准

- ❖ 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
- ❖ 重复性确认：重复管之间的 STD < 0.2

技术咨询: QQ/973107308

Tel/18927539098

Email/enzyvalley@163.com



2× Robust Probe qPCR ProMix with High ROX

货号: S032A/B

● 产品包装

组分	S032A	S032B
2× Robust Probe qPCR ProMix with High ROX	1mL	1mL × 5

● 储存条件

收到本产品后，请立即置于-20℃保存。从-20℃取出使用时，将冻存的 2× Robust Probe qPCR ProMix with High ROX 融解，然后轻轻颠倒混匀，待溶液完全均一后再行使用。如解冻后没有使用，须彻底混匀后重新冷冻。

● 产品概述

本产品是使用探针法进行 qPCR 实验的专用 2×即用型优化预混液。产品中包含基于化学修饰的 HotStart Taq DNA Polymerase、Mg²⁺、dNTPs、优化缓冲液和稳定剂等。使用时仅需加入模板、探针和引物即可进行 qPCR。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。

● 适用机型

本品包含用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差的 ROX Reference Dye, 适用于以下荧光定量 PCR 仪:

Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne™, StepOnePlus™;
其他需要添加高浓度 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪。

● 操作方法

1) 反应体系准备。

按下列组份配制 PCR 反应液 (反应液配制需在冰上进行)。

试剂	推荐使用量
Add Nuclease-Free ddH ₂ O	To 20 µL
2× Robust Probe qPCR ProMix with High ROX	10 µL
Forward Primer (10µM)☆☆	0.4 µL
Reverse Primer (10µM)☆☆	0.4 µL
TaqMan Probe(10µM)☆☆	0.2 µL
DNA 模板☆☆☆	X µL

☆☆ 通常引物终浓度为0.2µM可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在0.1 ~ 1.0 µM 范内调整引物浓度。

☆☆ 探针终浓度可以在50 nM-250 nM之间调整。

☆☆☆ 在20µl的反应体系中, DNA模板的添加量通常在100 ng以下。因不同种类的DNA模板中含有的靶基因的拷贝数不同, 必要时可进行梯度稀释, 确定最佳的DNA模板添加量。如果欲使用本制品进行Two Step RT-qPCR反应的第二步qPCR扩增反应, 第一步的RT反应液作为DNA模板时的添加量不要超过PCR反应液总体积的10%。

2) 反应程序设置

一般采用下表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反应。

注意: Hotstart Taq DNA 聚合酶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 10分钟。

阶段	温度	时间	循环	荧光信号采集
预变性	95°C	10 min	1×	否
PCR 反应	95°C	10 Sec	40×	否
	60°C ^Δ	30 Sec☆☆☆		是

☆☆☆☆ 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:

3) 反应结束后得到扩增曲线, 并进行标准曲线制作等。PCR 产物特意与否可以用琼脂糖凝胶电泳进行确认。

● 引物设计

进行Real Time PCR反应时, 设计反应性能良好的PCR引物至关重要。设计PCR引物时需遵循以下原则:

- ❖ 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。
- ❖ 引物的 GC 含量控制在40%-60%之间为好, 最佳为45%-55%之间。
- ❖ 引物设计时请尽量避免 T/C 或者 A/G 的连续结构。
- ❖ 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。
- ❖ 引物序列中 A、G、C、T 整体分布尽量均匀, 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;
- ❖ 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。

● 探针设计

- ❖ 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。
- ❖ 探针长度一般为18-40 bp。
- ❖ 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。
- ❖ 探针5' 端应避免使用碱基 G。
- ❖ 探针的退火温度应为65-67°C。
- ❖ 如果序列中包含多态性位点, 应使其位于探针序列中间。