



BlazeTaq™ Probe qPCR Mix

—探针法实时荧光定量 PCR 检测试剂

With ROX Reference Dye	Without ROX Reference Dye
Cat.No. QP036 (20 μ l \times 200 reactions)	Cat.No. QP046 (20 μ l \times 200 reactions)
Cat.No. QP037 (20 μ l \times 600 reactions)	Cat.No. QP047 (20 μ l \times 600 reactions)
Cat.No. QP038 (20 μ l \times 1200 reactions)	Cat.No. QP048 (20 μ l \times 1200 reactions)

性能优化的 All-In-One™ qPCR Primers, All-In-One™ miRNA qPCR Primers, miProfile™ miRNA qPCR Arrays, ExProfile™ Gene qPCR Arrays, All-In-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit 和 All-In-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
网址: www.genecopoeia.com
www.igenebio.com

使用手册

BlazeTaq™ Probe qPCR Mix

- I. 产品介绍
- II. 相关产品
- III. 试剂盒组份
- IV. 实验前准备
- V. 实验步骤
- VI. 实验案例
- VII. 查错指南
- VIII. 使用许可与质量保证

I. 产品介绍

BlazeTaq™ Probe qPCR Mix 是以探针法为基础的 Real Time PCR 反应试剂。本产品是一种即用型的 5×预混液，使用时只需加入模板、引物、灭菌水，即可对模板 DNA 进行快速、特异性的定量检测。

BlazeTaq™ Probe qPCR Mix 采用了新型抗体修饰的 BlazeTaq™热启动 DNA 聚合酶，室温时酶的活性被抗体封闭，更有效地抑制非特异性扩增；反应时只需 95°C 预变性 2 min 即可使酶完全被激活，可明显地缩短 qPCR 反应时间。此外，优化的 Buffer 体系显著提高 Real Time PCR 反应的灵敏度和重复性，同时具有扩增效率高、特异性强、检测范围广的特点。

II. 相关产品

GeneCopoeia 提供一套用于基因功能研究的完整解决方案，其相关产品如下表所示。

产品	描述
BlazeTaq™ SYBR® Green qPCR Mix 2.0	抗体修饰型 SYBR Green 染料法实时定量 PCR 试剂
SureScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit	用于将 mRNA 逆转录成第一链 cDNA
All-in-One™ qPCR Primers	高特异、高灵敏度的基因特异验证引物
ExProfile™ Gene qPCR Arrays	预制和定制的基因表达量定量检测阵列
All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit	用于将 miRNA 逆转录成第一链 cDNA
All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kits	基于 SYBR Green 染料的实时定量 PCR 试剂
All-in-One™ miRNA qPCR Primers	高特异、高灵敏度的 miRNA 特异验证引物
miProfile™ miRNA qPCR Arrays	预制和定制的 miRNA 表达量定量检测阵列
RNAzol® RT RNA Isolation Reagent	用于分离 mRNA, microRNA 或 total RNA

III. 试剂盒组份

BlazeTaq™ Probe qPCR Mix（试剂盒对应货号为 QP036, QP037, QP038）组份如下表所示。

组份货号	组份	体积	储存条件
QP036-01	BlazeTaq™ Probe qPCR Mix (5×)	1 × 800 μL 3 × 800 μL 6 × 800 μL	-20°C 至少保存 12 个月，也可-80°C分装储存，请注意避免反复冻融
QP001-02	ROX Reference Dye (30 μM)	1 × 80 μL 3 × 80 μL 6 × 80 μL	-20°C 避光，至少保存 12 个月，也可-80°C分装储存，请注意避免反复冻融

BlazeTaq™ Probe qPCR Mix (without ROX)（试剂盒对应货号为 QP046, QP047, QP048）组份如下表所示。

组份货号	组份	体积	储存条件
QP036-01	BlazeTaq™ Probe qPCR Mix (5×)	1 × 800 μL 3 × 800 μL 6 × 800 μL	-20°C 至少保存 12 个月，也可-80°C分装储存，请注意避免反复冻融

IV. 实验前准备

注意！在处理化学制品前，请穿戴实验服、一次性手套和护目镜。

注意事项:

1. BlazeTaq™ Probe qPCR Mix 与 miProfile™ miRNA qPCR Arrays 或 All-in-One™ miRNA First- Strand cDNA Synthesis Kit for miRNA expression profiling 配套使用时，请按照 miProfile™ miRNA qPCR array 使用说明书进行实验设计。
2. 为保证使用效果，试剂盒保存于-20 °C，避免储存或放置于 4°C 或室温条件下。注意避光保存。
3. 试剂解冻后请轻柔颠倒离心管数次以使试剂混合均匀，避免产生泡沫，短暂离心后备用。
4. 尽量使用 DNase Free 的灭菌超纯水。
5. 严格按照推荐的实验流程进行操作，避免核酸污染引起的非特异扩增。
6. 在设置 PCR 反应之前，请阅读所有程序。

V. 实验步骤

1. 解冻并轻柔混匀试剂盒中的 BlazeTaq™ Probe qPCR Mix (5×)。短暂离心使管中试剂集中于底部，冰上保存。根据定量 PCR 仪器需求，选择是否使用 ROX Reference Dye。

注：BlazeTaq™ Probe qPCR Mix (5×)可能出现黄色沉淀，不影响正常使用。解冻过程中轻柔振荡混匀，或者在 37°C 孵育 5~10 分钟，使沉淀完全溶解。

2. 按照下表内容，在 4°C（冰上）或者室温准备 qPCR 反应液。

BlazeTaq™ Probe qPCR Mix 使用说明书

试剂	体积	终浓度
BlazeTaq™ Probe qPCR Mix ^a	4 µL	1×
PCR forward primer (2 µM) ^b	2 µL	0.2 µM ^c
PCR reverse primer (2 µM)	2 µL	0.2 µM
Template ^d	2 µL	
Probe (10 µM)	0.2 µL	0.1 µM
ROX Reference Dye ^e (30 µM) if needed	0.4 -0.1 µL	600 nM~150 nM
dd H ₂ O	to 20 µL	

- a. 使用 BlazeTaq Probe qPCR Mix 一半的体积时，需要相应地减半其他组份的体积。如果总的 qPCR 反应体系发生变化，对应的反应体系中各试剂体积需要做相同比例的调整。
- b. 引物是确保 qPCR 成功的重要因素，GeneCopoeia 提供经功能验证的人、小鼠或大鼠等多种属引物，即使在低拷贝数基因的情况下也能进行特异和灵敏的扩增。在设计自己的引物时，您可能希望使用 Oligo 引物分析软件(Molecular Biology Insights)或 primer Premier 软件(Premier Biosoft International)。
- c. qPCR 引物反应终浓度一般介于 0.2 ~0.6 µM 之间。通常 PCR 反应体系中引物的终浓度为 0.2 µM 时，可以获得比较好的实验结果。如果 qPCR 扩增效率比较低，可以适当提高引物使用浓度，但是过高的引物浓度可能会降低 qPCR 扩增特异性。GeneCopoeia 提供的引物已经过实验验证，可以获得特异性好、灵敏度高的扩增结果。
- d. 在进行 qPCR 反应之前，逆转录得到的第一链 cDNA 需要进行稀释，避免逆转录体系中残余的一些试剂对 qPCR 扩增效率产生影响。通常，一个 qPCR 反应中的 DNA 模板量应少于 100 ng，因为不同的 DNA 模板中靶基因的拷贝数不一样，有必要对不同的 DNA 模板进行梯度稀释来优化最佳的 DNA 模板使用量。
- e. ROX Reference Dye 可用于校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。不同的定量 PCR 仪使用的 ROX Reference Dye 浓度不同，因此，根据不同的定量 PCR 仪器，选择使用不同浓度的 ROX Reference Dye。常见的定量 PCR 仪，使用 ROX Reference Dye 参考如下：

仪器类型	ROX 使用量 (20 µl 体系)	终浓度
BioRad iCycler, MyiQ, iQ5, CFX-96, CFX-384, Eppendorf Mastercycler realplex, Roche LightCycler 480, LightCycler 2.0	None	No ROX
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT and 7900HTFast, ABI Step One, ABI Step One Plus	0.4 µL (0.2-0.4 µL)	600 nM (300-600 nM)
ABI 7500, 7500 Fast, ABI ViiA7, Stratagene Mx3000P, Mx3005P, Mx4000,	0.1 µL (0.02-0.1 µL)	150 nM (30-150 nM)

注：其他未列在上表中的定量 PCR 仪器类型，请根据仪器的使用说明书摸索合适的 ROX Reference Dye。

3. 轻柔混匀 qPCR 预混液并短暂离心，按照反应体系说明将预混液加入 PCR 反应管或者反应板中，短暂离心确保预混反应液充满 PCR 反应管底部。
4. 根据下表设置两步法 qPCR 程序进行 qPCR 反应（以 Roche LightCycler 480 定量 PCR 仪器推荐的反应程序为例）。

循环数	步骤	温度	时间	检测与否
1	预变性	95°C	2 min	否
40	变性	95°C	10 sec	否
	退火和延伸	60°C	30 sec	是

- i. BlazeTaq Probe qPCR Mix 中使用的 DNA 聚合酶是一种抗体修饰的热启动酶，95°C 预变性 2min 可充分激活。
- ii. qPCR 扩增产物的 DNA 片段长度一般为 80~150bp 之间，个别情况下扩增产物的 DNA 片段长度达到 500 bp 也是可以接受的，请根据扩增产物的长度适当延长延伸的时间。另外，部分仪器由于硬件或控制用的软件等特殊原因，延伸时间无法设定为 15 秒，此时请根据仪器的使用说明书，设定最适的可设定时间（如 Applied Biosystems 7000/7300 为 31 秒以上，7500 为 32 秒以上）。
- iii. 以上的反应条件主要参考 Roche LightCycler 480 定量 PCR 仪器进行设置，若使用其他的定量 PCR 仪，请参考对应的仪器使用说明书来设置具体的延伸时间及熔解曲线分析反应程序。

VI. 实验案例

案例：以 HeLa 细胞 cDNA 为模板，进行三重 PCR 反应，检测的靶基因为 ACTB、GADPH 和 B2M

实验仪器：Roche LightCycler 480-2 Real Time qPCR

实验过程：

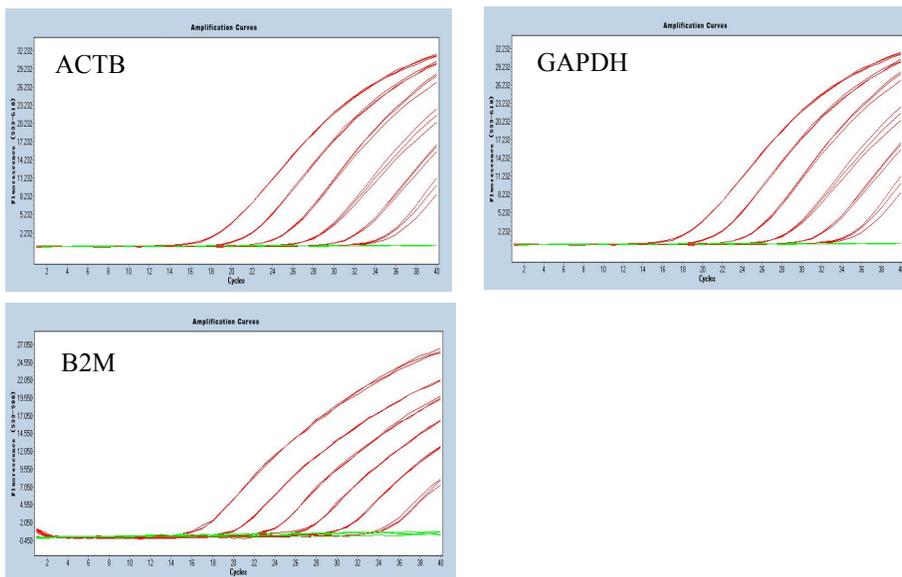
1. 将 cDNA 进行 10 倍梯度稀释，共 6 个梯度浓度，得到的 cDNA 浓度范围为 100 ng-1 pg。
2. 按照如下表格所示，在冰上配制 qPCR 反应预混液。

试剂	体积
BlazeTaq™ Probe qPCR Mix (5×)	4 μL
each of PCR forward primer (10 μM)	0.5 μL
each of PCR reverse primer (10 μM)	0.5 μL
each of Probe(6uM)	0.5 μL
ddH ₂ O	to 15 μL

3. 轻柔混匀 qPCR 预混液，并短暂离心。
4. 每个 PCR 反应管中分别加入 5 μL 梯度稀释的 cDNA，使用 5 μL ddH₂O 作为无模板对照（NTC 组）。
5. 根据下表设置 qPCR 程序：

循环数	步骤	温度	时间	检测与否
1	预变性	95°C	2min	否
40	变性	95°C	10 sec	否
	延伸	60°C	30 sec	是

6. qPCR 结果分析：扩增曲线



7. qPCR 结果分析：标准曲线分析。

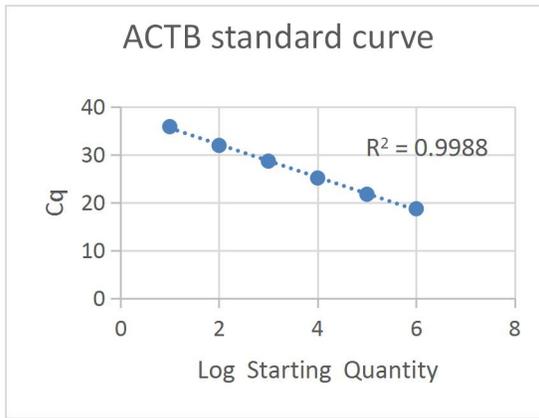


图 4: ACTB 扩增产物标准曲线图

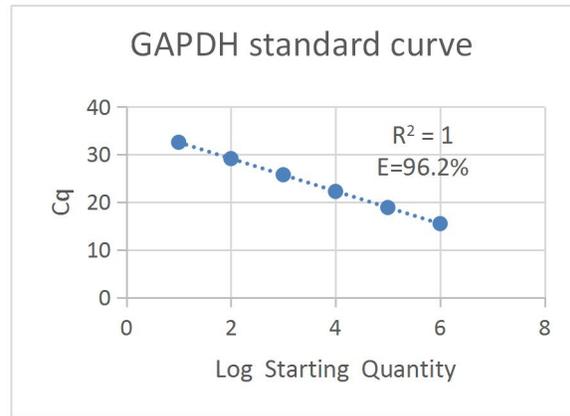


图 5: GAPDH 扩增产物标准曲线图

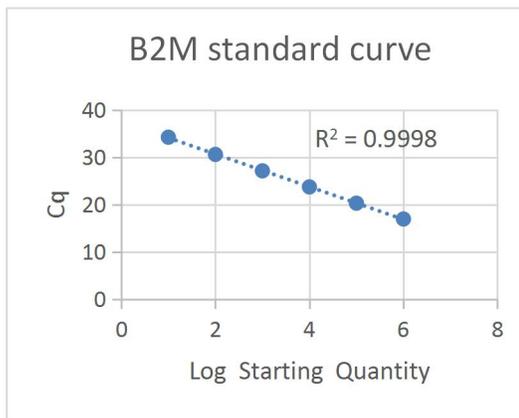


图 6: B2M 扩增产物标准曲线图

8. **结论:** 以 HeLa 细胞 RNA 逆转录的 cDNA 为模板, 使用本试剂产品进行扩增灵敏度检测, 通过结合分析扩增曲线和标准曲线, 显示 BlazeTaq™ Probe qPCR Mix 可以从低至 1 pg 的 cDNA 样本中检测出 ACTB、GAPDH 和 B2M。

VII. 查错指南

<p>异常的扩增曲线 或 qPCR 反应结果</p>	<p>荧光检测温度可能设置不当，请做正确的调整。一般情况下，荧光检测设置在 qPCR 循环中引物延伸阶段。</p> <p>qPCR 仪器的反应孔位置可能与实际样品摆放位置设置不一致，导致读不到荧光信号值。</p> <p>qPCR 反应条件、引物浓度和引物序列可能不合适，请重新调整引物浓度和退火温度。如果还不能正常工作，请重新设计引物。</p> <p>样本纯度（DNA 或 RNA 模板）可能不够，请对样本进行纯化处理，如苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀。如果样本为 cDNA 模板，可以将 cDNA 做系列梯度稀释，通过生成标准曲线来分析扩增效率，以便判断 qPCR 反应中是否有杂质污染。</p> <p>使用 3% 琼脂糖电泳对 qPCR 产物进一步分析。使用琼脂糖凝胶或 PAGE 电泳对 qPCR 引物的纯度进行分析。可以使用苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀的方法对 qPCR 引物进行纯化处理。</p>
<p>没有荧光信号 (Ct) 或者 Ct 值很高</p>	<p>检查是否有 PCR 产物生成（可以通过琼脂糖凝胶电泳检测），排除由于仪器检测器设置错误的可能。</p> <p>没有足够的 PCR 循环数。对于比较好的检测灵敏性，PCR 循环数最好设置到 35 个循环以上，但是超过 45 个循环数可能带来太多的背景信号。</p> <p>没有足够的 PCR 反应模板或者模板可能发生降解。建议采用高浓度的稀释模板重新进行 PCR 反应，同时避免反复冻融模板样本。</p> <p>扩增效率低、PCR 反应条件不合适。建议重新设计引物、优化反应条件。</p>

VIII. 使用许可与质量保证

使用限制

以下条款适用于 BlazeTaq™ Probe Mix 产品。若您不能接受这些条款，请在 5 个自然日内将产品完整退还给 GeneCopoeia。产品购买者需遵守最终用户限制许可条例。本产品仅限购买者内部研究使用，不得用于人体或诊断、治疗。未经 GeneCopoeia 事先书面同意，本产品不得转售，不得重新包装或修改后转售，不得用于生产商用产品。

质量保证

GeneCopoeia 保证产品与产品数据表中描述的规格保持一致。若经 GeneCopoeia 证实产品未达到规格要求，GeneCopoeia 将为您替换产品。若无法替换，GeneCopoeia 将退款给购买者。此质量保证仅适用于最初产品购买者。GeneCopoeia 仅负责替换产品或退还实际的购买金额。对于由使用或不正确使用产品产生的损害或使用其他相关材料和试剂产生的损耗，GeneCopoeia 不承担责任。GeneCopoeia 不提供任何形式的明示的或者默示的保证，包括对适销性、适用于特定用途的默示保证。

GeneCopoeia 致力于为消费者提供高质量的研究产品。如果您对 GeneCopoeia 的产品有任何问题或疑虑，请拨打 4006-020-200 联系我们。

© 2019, GeneCopoeia, Inc.

GeneCopoeia, Inc.
9620 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850
Tel: 301-762-0888 Fax: 301-762-3888
Email: inquiry@genecopoeia.com
Web: www.genecopoeia.com

广州易锦生物技术有限公司
广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路 3 号
广州国际企业孵化器 F 区 8 楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
网址: www.genecopoeia.com (英文) www.igenebio.com (中文)