

版本号: FP130820

# FastFire qPCR PreMix (Probe)

## FastFire快速定量PCR试剂 (探针法)

目录号: FP208

### 产品内容

产品组成	FP208-01 20 $\mu$ l $\times$ 125 rxn	FP208-02 20 $\mu$ l $\times$ 500 rxn
2 $\times$ FastFire qPCR PreMix (Probe)	1.25 ml	4 $\times$ 1.25 ml
50 $\times$ ROX Reference Dye	250 $\mu$ l	1 ml
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	2 $\times$ 1 ml	5 $\times$ 1 ml

### 储存条件

收到本产品后, 请立即置于-20 $^{\circ}$ C避光保存。从-20 $^{\circ}$ C取出使用时, 将冻存的FastFire qPCR PreMix和ROX Reference Dye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。(在解冻过程中盐会出现分层现象, 未混匀进行冷冻, 盐晶体的析出将会对酶造成损害)。如需一段时间内经常取用, 可在2-8 $^{\circ}$ C条件下储存3个月。避免反复多次冻融。

### 产品简介

FastFire qPCR PreMix利用序列特异性探针, 可对DNA进行快速、灵敏的Real-Time PCR定量检测。优化的预混液使PCR的运行时间缩短60%以上。

FastFire qPCR PreMix即用型预混液含有热启动酶和独特的PCR缓冲液, 确保在任何Real-Time PCR仪上均可进行灵敏的定量PCR检测。

---

## 试剂盒特点

1. FastFire qPCR PreMix采用了特异的抗体修饰热启动DNA聚合酶，配合精心优化的Buffer体系，使PCR反应时间比一般qPCR缩短60%，并且具有定量准确，扩增效率高，重复性好和宽广的可信范围的特点。
2. 本产品经过优化使荧光信号的释放达到最佳的效果，同时充分降解了探针荧光淬灭基团的信号释放，用相同量的模板将得到更强的信号。
3. FastFire qPCR PreMix为2×浓度的预混Mix形式，PCR反应液配制时，只需加入模板、引物、探针、灭菌蒸馏水便可进行Real-Time PCR反应，操作简单方便。
4. 本产品附带ROX Reference Dye，用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，方便客户针对不同型号荧光定量PCR仪时选择对应浓度使用。

## 试剂盒原理

本产品采用了特异的抗体修饰热启动DNA聚合酶进行PCR扩增，通过在PCR反应液中加入荧光探针，然后检测反应进程中的荧光强度，达到检测PCR产物扩增量的目的。

1. 本产品中特异的抗体修饰热启动DNA聚合酶，95℃条件下孵育1 min即可激活全部酶活，同时配合精心优化Buffer体系，可大大缩短变性、退火和延伸时间，使PCR总运行时间缩短60%，更快获得实验结果，而不影响PCR反应效果，并且具有定量准确，扩增效率高，重复性好和宽广的可信范围的特点。
2. 本产品针对cDNA模板和gDNA模板结构组成的差异，对PCR的反应步骤进行了特别的优化，使较难扩增的gDNA模板也能获得良好的PCR结果。
3. 本产品经过优化特别有利于Taq酶发挥其5'-3'外切酶活性，使荧光信号的释放达到最佳的效果。此外FastFire qPCR PreMix体系也充分降解了探针荧光淬灭基团的信号释放，经过上述优化，用相同量的模板将得到更强的信号。

## 注意事项

1. 建议PCR反应的预变性条件，对于cDNA模板，设定为95℃ 30-60 s；对于gDNA模板，设定为98℃ 1-2 min，用以激活热启动酶，并使模板解链充分。
2. 如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。使用时请上下颠倒轻轻混匀，请不要使用振荡器进行混匀，尽量避免出现泡沫，并经瞬时离心后使用。
3. 本产品中不含有荧光探针。
4. 引物终浓度为300 nM，探针终浓度为200 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。需要进一步优化引物浓度的，可以在50-900 nM范围内调整；需要进一步优化探针浓度的，可以在50-250 nM范围内调整。
5. 20 μl反应体系中，基因组DNA或cDNA模板的使用量一般小于100 ng，逆转录产物作为模板时，使用量应不超过PCR体系终体积的20%。

## 操作方法

<1> 建立Real-Time PCR反应体系:

1. 融解FastFire qPCR PreMix (如果保存在-20°C), ROX Reference Dye, 模板, 引物、探针和RNase-Free ddH<sub>2</sub>O, 并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀。

2. 建议置于冰上进行Real-Time PCR反应液的配制。

反应体系:

组成成分	50 µl 体系	25 µl 体系	20 µl 体系	终浓度
2× FastFire qPCR PreMix	25 µl	12.5 µl	10 µl	1×
正向引物 (10 µM)	1.5 µl	0.75 µl	0.6 µl	300 nM*1
反向引物 (10 µM)	1.5 µl	0.75 µl	0.6 µl	300 nM*1
荧光探针 (10 µM)	1.0 µl	0.5 µl	0.4 µl	200 nM*2
DNA模板	—	—	—	≤200 ng
50× ROX Reference Dye*3	—	—	—	—
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	至50 µl	至25 µl	至20 µl	—

\*1引物终浓度为300 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时, 可增加PCR反应体系中的引物浓度; 发生非特异扩增时, 可适当减少PCR反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的, 可以在50-900 nM范围内调整。

\*2探针的浓度与使用的Real-Time PCR扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关, 实际使用时请参照仪器说明书, 或各荧光探针的具体使用说明进行。通常探针终浓度为200 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。需要进一步优化探针浓度的, 可以在100-500 nM范围内调整。

\*3几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表:

仪器	终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/Step One等	5×(例如: 5 µl ROX/50 µl体系)
ABI 7500、7500 Fast; Stratagene Mx3000P、Mx3005P和Mx4000等	1×(例如: 1 µl ROX/50 µl体系)
Roche仪器, Bio-Rad仪器, Eppendorf仪器等	不用添加

<2>进行Real-time PCR反应

建议采用两步法PCR反应程序进行反应: 若模板量较低等因素导致扩增效果不佳, 可使用三步法程序进行PCR反应。

### 两步法反应程序:

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C △1	1 min	预变性	否
PCR反应	40×	95°C △1	5 sec	变性	否
		60°C △2	15 sec△3	退火/延伸	是

### 三步法反应程序:

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C △1	1 min	预变性	否
PCR反应	40×	95°C △1	5 sec	变性	否
		50-60°C △4	10 sec	退火	否
		72°C	15 sec△3	延伸	是

△1 以cDNA模板时为预变性温度为95°C，以基因组DNA为模板时为98°C。

△2 请先使用60°C 15 sec进行扩增。如果需要进一步优化，可以尝试在56-66°C 范围内进行。

△3 使用不同型号仪器进行时间设定时，请按照仪器使用说明书要求进行实验操作，几种常见仪器的时间设定见下表：

使用Roche, ABI 7500 Fast, BioRad和Agilent等公司荧光定量PCR仪时请设定在15 sec。
使用ABI 7900HT/7900HT Fast/ViiA 7/StepOne/StepOnePlus时请设定在20 sec。
使用ABI 7000和7300时请设定在31 sec。
使用ABI7500时请设定在32 sec。

△4 通常引物退火温度比引物的解链温度(T<sub>m</sub>)低5°C，如果引物碱基数较少，可以适当提高退火温度，这样可以使PCR的特异性增加；如果碱基数较多，那么可以适当减低退火温度。

3. 盖上反应管，轻柔混匀。可短暂离心，确保所有组分均在管底。

4. 将反应体系置于荧光定量PCR仪中，开始反应。

## 常见问题

### 1. 低浓度模板时扩增曲线混乱，荧光强度变弱

原因	解决办法
目标DNA的拷贝数过少	反应液中的目标DNA拷贝数只有几倍到几十倍时，拷贝数散乱的概率变大，容易形成线性混乱。请适当提高样品浓度再进行反应。
与引物二聚体发生竞争	目的片段扩增的同时出现引物二聚体的扩增，由于竞争使目的片段的扩增反应变弱。请摸索反应条件或重新设计引物，以防止引物二聚体的形成。
DNA被反应离心管吸附而损失	模板浓度较低或样品稀释后长时间存放时，会导致DNA被反应离心管吸附而损失。请提高样品浓度再进行反应。如果对样品进行稀释，建议稀释后立即进行反应。

### 2. NTC可见扩增

原因	解决办法
发生交叉污染	请更换新的试剂或灭菌水。仍无法得到改善时，请尝试到新的实验环境进行操作。
仪器设定误差 (进行多重PCR时等)	当使用几种荧光探针时，请正确设定荧光测定，防止出现因不同染料的光谱交叉而导致的检测信号差异。

### 3. 定量值重现性差

原因	解决办法
仪器方面的故障	因为仪器的不适用，在温度管理或检测时产生重现性差。请根据相应仪器的说明书进行点检。
样品纯度不好	不纯的样品会导致实验的重现性差。
稀释的模板放置太久	浓度较低的DNA溶液存放时间较长时，由于被管壁吸附从而实际浓度会更低，建议从原液重新稀释后再进行反应。另外，通过梯度稀释的标准样品最好每次使用时直接从原液稀释。
引物或探针质量下降	尽量避免新合成引物批次间的差异，可以使用原来质量好的引物做为对照。
PCR 反应条件、引物浓度、序列等不恰当	扩增效率差的PCR 容易产生重现性差。通过变更引物和探针的浓度或PCR 反应条件来进行调整。扩增不好时，一般可降低退火温度或提高引物浓度，也可以延长延伸时间。如模板的GC 含量较高，可延长变性时间。仍得不到改善时，建议重新设计引物和探针。
计量误差	反应体积太小会导致检测精度下降。请根据定量PCR仪推荐的反应体积重新实验。

## 进行RT-qPCR反应时的操作建议

进行RT-PCR反应时，有三种cDNA第一链合成试剂盒可以选择，分别是FastQuant RT Kit(with gDNase) (KR106)，Quant cDNA第一链合成试剂盒(KR103)，和TIANScript cDNA第一链合成试剂盒(KR104)。

**FastQuant RT Kit(with gDNase) (KR106)** 可3 min去除基因组DNA的残留，使基因定量结果更加真实可信，适用于模板量为50 ng-2 μg的总RNA的快速反转录（共需21 min），是荧光定量PCR的反转录实验的最佳选择。

1. 将模板RNA在冰上解冻；5×gDNA Buffer、FQ-RT Primer Mix、10×Fast RT Buffer、RNase-Free ddH<sub>2</sub>O在室温（15-25℃）解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

以下操作步骤请在冰上进行。为了保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先配制成Mix，然后再分装到每个反应管中。

2. 按照表1的基因组DNA的去除体系配制混合液，彻底混匀。简短离心，并置于42℃，孵育3 min。然后置于冰上放置。

表1 gDNA去除反应体系

组成成分	使用量
5×gDNA Buffer	2 μl
Total RNA	-
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	补足到10 μl

3. 按照表2的反转录反应体系配制混合液。

表2 反转录反应体系

试剂	使用量
10×Fast RT Buffer	2 μl
RT Enzyme Mix	1 μl
FQ-RT Primer Mix	2 μl
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	补足到10 μl

4. 将反转录反应中的mix，加到gDNA去除步骤的反应液中，充分混匀。

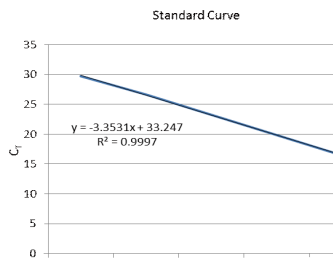
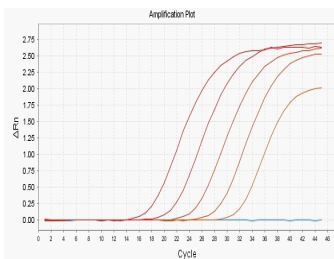
5. 42℃，孵育15min反转录。

6. 95℃，孵育3min之后放于冰上，得到的cDNA可用于后续实验，或低温保存。

## 反应举例 (使用Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System)

通过Real-Time RT-PCR对Human .GAPDH mRNA进行检出。

使用FastFire qPCR PreMix, cDNA量相当于Total RNA 1 pg-10 ng。Negative Control以ddH<sub>2</sub>O做为模板。



### 引物设计说明

进行Real-time PCR反应时, PCR引物的设计非常重要。设计PCR扩增效率高, 反应特异性强的引物可以参考以下要求。

◆ 设计引物要求如下:

引物长度	18-30个碱基
GC含量	40-60%
Tm值	引物软件都可以给出Tm, 与引物长度, 碱基组成, 引物使用缓冲的离子强度也有关。 上下游引物的Tm值要尽量接近。 简单的Tm计算公式为: $Tm = 4^{\circ}C(G + C) + 2^{\circ}C(A + T)$ 。 一般采用较引物Tm值低5 $^{\circ}C$ 作为PCR退火温度。 提高退火温度可以增加PCR反应的特异性。
引物及PCR扩增产物序列	PCR扩增产物长度最好在100-150 bp之间。 尽量避免在模板的二级结构区域设计引物。 避免上下游引物3'端之间形成2个或以上的互补碱基以减少引物二聚体的形成。 引物3'端碱基不能有多于3个连续的G或C。 引物自身不应存在互补序列, 否则引物自身会折叠成发夹状结构。 避免引物3'末端碱基为T。 引物序列中A、T、G、C要尽量均匀分布。

### 探针设计说明

请准备适用于目的基因序列的荧光probe。Probe序列的设计请参考各Probe的设计指导。

另外, 请尽可能使用HPLC级别以上纯化的Probe, 否则残留的未结合的荧光染料会造成基线上飘从而降低检测的灵敏度。

#### 4. 扩增效率低于90% (slope<-3.6)

引物质量不好	当引物质量不好时, 会导致扩增效率大幅下降。可从引物原液重新稀释, 或重新合成引物。
计算扩增效率时未排除偏离直线的Ct值	计算扩增效率时包含了偏离直线的Ct值, 增大了计算值的误差。应将偏离直线的Ct值排除后再计算。
反应条件不合适	请优化引物, 探针浓度及PCR反应条件。

#### 5. 扩增效率高于110% (slope>-3.1)

计算扩增效率时未排除偏离直线的Ct值	计算扩增效率时包含了偏离直线的Ct值, 增大了计算值的误差。应将偏离直线的Ct值排除后再计算。
样品中的杂质对高浓度模板抑制明显	当样品含有杂质时, 对高浓度模板抑制明显, 从而增大了扩增效率。请降低样品浓度, 或进一步纯化模板。

#### 6. 扩增曲线荧光信号很弱, 或扩增曲线呈锯齿状

原因	解决办法
检测光光谱设定误差	由于目前不同荧光定量PCR仪的原理和提供的检测光光谱范围的差异, 因此在选择探针的发光基团和淬灭基团时一定要根据所用的仪器型号设置的可检测的荧光信号范围内选择。请参照仪器的使用说明书, 重新确定参数设置。
荧光探针纯度太低	请使用HPLC级别以上纯化的Probe, 否则残留的未结合的荧光染料会造成基线上飘, 从而导致扩增产物所产生的荧光值变低。
荧光探针质量较差	由于探针保存中分解导致基线上飘, 从而导致扩增产物所产生的荧光值变低。此外, 一部分荧光染料不适合含有EDTA的buffer进行保存。请按照Probe合成公司推荐的保存条件。
荧光采集时间太短	对部分仪器, 需要更长的延伸时间来充分采集荧光。扩增曲线锯齿状较明显时, 将延伸时间设定为45-60 sec可得到改善。