



# KT AntiQ qPCR Probe Master Mix

## 目录号

MG-QP-02

## 产品组成

组分	规格
2×KT AntiQ qPCR Probe Master Mix	5×1.0mL
ROX Reference Dye I (High)	200 μL
ROX Reference Dye II (Low)	200 μL

## 保存条件

-20°C避光保存 12 个月。

## 产品简介

本产品是采用 Probe 探针法进行 qPCR 反应的专用试剂。产品中包含抗体修饰的新型热启动 KT AntiQ DNA polymerase 和精心优化的 Buffer，能有效抑制低温下的非特异性扩增，大大提高了反应特异性和扩增效率，能够在更宽广的范围内对靶基因进行准确定量。此外，本产品根据不同的仪器型号配有两种 ROX Reference Dye (High/Low)，用来校正仪器孔间的荧光误差。

## 产品特点

- ◇ 高特异性：采用抗体修饰的新型热启动 KT AntiQ DNA polymerase 和精心优化的 Buffer；
- ◇ 操作简便：2×预混液中包含有 qPCR 反应所需所有组分，只需加入模板、引物、探针、ROX Reference Dye 和水即可进行反应。

## 适用范围及适用机型

本产品适用于试剂盒提取的基因组 DNA、cDNA、质粒 DNA 和 λDNA 等样本的探针法荧光定量检测。

### 常见仪器需选择的 ROX 参考：

ROX	品牌	仪器型号
ROX Reference Dye I (High)	ABI/Thermo/Life	5700、7000、7300、7700、7900、7900HT、7900HT Fast、StepOne™、StepOne Plus™

本产品仅供科研使用



ROX Reference Dye II (Low)	ABI/Thermo/Life	7500、7500Fast、ViiA™7、QuantStudio3/5/6 Flex/7 Flex/12K Flex
	Stratagene	MX3000P™、MX3500P™、MX4000™
No ROX	ABI/Thermo/Life	PikoReal™ Cyclers
	Bio-Rad	IQ™5、iCycleriQ5™、Chromo4™、CFX96™、CTX384™/MyiQ™、MiniOpticon™、Opticon®、Opticon2、Opticon4、MiniOpticon™
	Eppendorf	Mastercycler™ep realplex、realplex 2s
	Illumina	Eco QPCR
	Cepheid	SmartCycler®
	Qiagen/Corbett	Rotor-GeneG/Q®、Rotor-Gene®3000、Rotor-Gene®6000
	Roche	Applied Science LightCycler®480、LightCycle®2.0、LightCycle®96
	TaKaRa	Thermal Cycler Dice™Real Time、System TP700/TP800/TP850/TP900/TP950
	Analytikjena	qTower 2.0、qTower 2.2
	杭州博日	LineGene 9600、LineGene K Plus

## 注意事项

1. 使用前请充分溶解混匀，尽量避免反复冻融，以免酶活下降；
2. 为了避免气溶胶污染，建议使用核酸清洁剂对实验台面及操作环境进行清洁；
3. 为不影响后续实验，建议做预实验检查引物有效性和特异性；
4. 上机前，注意消除体系中的气泡，以免对结果造成影响。

## 使用方法

### 操作示例

按下表配制 qPCR 反应体系（冰上配制）

组分	20 μL 体系	终浓度
2×KT AntiQ qPCR Probe Master Mix	10 μL	1×
Primer 1 (10 μM) <sup>a</sup>	0.8 μL	0.4 μM
Primer 2 (10 μM) <sup>a</sup>	0.8 μL	0.4 μM
Probe <sup>b</sup>	As require	-



ROX Reference Dye I/II (High/Low)	0.4 $\mu$ L	1 $\times$
Template DNA <sup>c</sup>	As require	-
ddH <sub>2</sub> O	Up to 20 $\mu$ L	-

- 引物终浓度推荐 0.4  $\mu$ M, 当反应性能较差时, 可在终浓度 0.2~1.0  $\mu$ M 范围内调整引物浓度;
- 探针终浓度可以在 0.1  $\mu$ M~0.5  $\mu$ M 之间调整;
- 不同种类的 DNA 模板中含有的靶基因拷贝数不同, 必要时先梯度稀释再进行 qPCR 反应。若模板为 cDNA 原液, 则使用体积不超过 qPCR 反应总体积的 1/10, 即 2  $\mu$ L/20  $\mu$ L 体系。

## 推荐的 qPCR 程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性 <sup>a</sup>	95 $^{\circ}$ C	2~5 min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	10 s	40 cycles
退火/延伸 <sup>b</sup>	60~65 $^{\circ}$ C	20~50 s	

- cDNA 模板预变性 2min, 基因组 DNA 模板预变性 5min;
- 2 个以上的多重探针检测建议将退火延伸时间延长至 50s。

## 常见问题与解决办法

### Q1: 无 Ct 值出现?

#### A1:

- 采集荧光信号的步骤有误。检查程序设置, 两步法扩增在退火延伸步骤采集信号, 三步法扩增在延伸阶段采集信号;
- 模板或 ROX 使用错误。当 ROX 浓度太低或太高时, Ct 值可能显示为 Unknown 或空白, 根据仪器类型选择合适的 ROX;
- 引物或模板降解。PAGE 电泳检测引物完整性, 琼脂糖凝胶电泳检测模板 DNA 或 RNA 的质量及完整性, RNA 模板建议重新逆转录获得 cDNA, cDNA 应尽快使用;
- 模板量不足。适当增加模板用量或重新制备高浓度模板。

### Q2: 实验重复性差?

#### A2:

- 加样存在误差。使用性能较好的移液枪, 配制预混液后分装, 减少移液误差;
- 荧光定量 PCR 仪器不同位置温度控制不一致。定期校准仪器;
- 模板浓度低或拷贝数低。适当增加模板用量。

### Q3: 扩增曲线形状异常?

#### A3:



- (1) 扩增曲线不光滑。信号太弱，经系统矫正后产生，可提高模板浓度重复实验；
- (2) 扩增曲线断裂、骤降。模板浓度较高或反应管内留有气泡，减小基线终点(CT 值-4)重新分析数据，或上机前离心并仔细检查反应管内是否有气泡残留；
- (3) 分析数据时通道选择不正确。如没有在体系中加入 ROX，但分析时在仪器设置中选择了 ROX 选项，应根据具体操作体系选择合适的分析条件。

**Q4: 同一试剂在不同仪器上产生不同的曲线?**

**A4:**

分析扩增效率，灵敏度，特异性，如果扩增效率在 90%~110%，且都是特异性扩增，则数据均可分析使用。