

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2
		100 RXN (20 μ L/RXN)	500 RXN (20 μ L/RXN)
Entrans 2X SNP Genotyping qPCR Probe Master Mix (with UDG)	RM21226	1 mL	5 mL
50X ROX Dye I	RM21465	40 μ L	200 μ L
50X ROX Dye II	RM21466	40 μ L	200 μ L

产品说明

Entrans 2X SNP Genotyping qPCR Probe Master Mix (with UDG) 是一款适用于 Taqman MGB 探针 SNP 分型的预混液产品, 其中包含反应缓冲液, 热启动 Taq 聚合酶, 热敏 UDG 酶, 使用时仅需加入模板、引物和探针。本产品引入 dUTP/UDG 防污体系, 热敏感 UDG 在室温下就可将含 U 的 DNA 链迅速降解, 95°C 预变性时热敏 UDG 迅速失活, 去除反应体系中的 DNA 污染, 保证分型的准确性。本产品具有低浓度模板分型准确、重复性好等优点。

保存温度

-20°C

适用机型

类型	仪器
无需添加 ROX 参比染料	Bio-Rad iCycler 系列, Roche Light Cycler 系列, Qiagen/Corbett 系列等
50X ROX Dye I (High Rox)	ABI 7000/7300/7700/7900, ABI StepOne/StepOnePlus
50X ROX Dye II (Low Rox)	ABI 7500, ABI ViiA TM 7, ABI Quanta Studio 系列, Stratagene 系列, Corbett Rotor Gene 3000 等

注意事项

- Entrans 2X SNP Genotyping qPCR Probe Master Mix (with UDG) 在使用前请充分解冻。使用过程中避免反复冻融, 建议分装保存。
- Entrans 2X SNP Genotyping qPCR Probe Master Mix (with UDG) 在使用前请轻轻混匀, 避免产生气泡; 取用之前应混匀并离心。使用后应立即放回 -20°C 冰箱保存。
- 本产品含有聚合酶, 使用时请置于冰上, 短时间内多次使用可在 4°C 暂存, 应尽量避免反复冻融。
- 反应液配制和分装须使用灭菌的枪头, 推荐使用带滤芯枪头。
- 为提高反应的成功率, 建议使用高质量的 DNA 模板。

操作说明

实验前准备

1. EP 管、PCR 管、移液器、枪头、冰盒。
2. PCR 探针、引物与模板。
3. 荧光定量 PCR 专用 tube 或平板及密封耗材等。
4. 用户需自备的试剂：DNA 模板、引物、探针、Nuclease-free H₂O。

实验方法

1. 配制反应体系

推荐冰上配制反应体系，以 20 μL 体系为例：

试剂	20 μL
Entrans 2X SNP Genotyping qPCR Probe Master Mix (with UDG)	10 μL
Forward Primer (10 μM)	0.25-0.5 μL
Reverse Primer (10 μM)	0.25-0.5 μL
Probe (10 μM)	0.25-0.5 μL
50X ROX Dye (as required by instrument guidelines)	0.2 μL
DNA Template	100 pg~100 ng
Nuclease-free H ₂ O	to 20 μL

- (1) 计算试剂所需体积，并预留足够的余量（一般余量要多于所需体积的 10%）。
- (2) 在干净的 PCR 管或 EP 管内精确分取液体，注意防止液体污染以及操作引起的误差。
- (3) 分别加入相应的引物、探针、模板和 Mix 等组分，待所有组分加入后，小心振荡混匀，最后瞬时离心。
- (4) 将配制的反应溶液转移到专用的 qPCR 板（管）内，用配套的密封耗材仔细密封（注意转移时不要引起气泡，且液体尽量不要接触薄膜）。
- (5) 500 rpm 离心 qPCR 板（管）2~3 min，准备上机。

2. 设置反应程序

请按照不同品牌荧光定量 PCR 仪的使用说明书要求进行设置。

步骤	温度	时间	循环数 (Cycles)
预变性	95°C	5 min	1
循环反应	95°C	5-15 s	40~45
	60°C	15-30 s (可选采集荧光)	
终点信号采集	60°C	1 min (采集荧光)	1

注：

- a. UDG 酶为热敏型，在室温可发挥功能，在 PCR 程序设置前就已进行工作，当预变性时 UDG 酶失活。
- b. 一般情况下预变性时间建议最短不短于 3 min，最长不超过 10 min；循环反应中变性时间最短不短于 5 s，最长不超过 15 s；循环反应中延伸时间最短不短于 10 s，最长可根据自身所用引物探针及信号采集需要自行调整。
- c. 如分型结果异常，可在循环反应的退火延伸步骤选择采集荧光，监测反应体系在扩增过程中的荧光信号变化情况。

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，提高模板投入量并重复实验。
- b. 个别扩增曲线骤降：可能反应管内有气泡，由于温度升高后气泡破裂，使仪器检测到的荧光信号突然降低所致。处理样本时要注意离心、加样过程中尽量避免出现气泡。
- c. 扩增曲线上飘：仪器默认基线为 3-15 个循环的荧光值，可根据实际扩增情况调整基线。另外模板、引物降解或引物扩增效果不好也可导致曲线上飘，在进行 qPCR 之前请确认模板浓度和引物质量是否可用。

2. 反应结束无扩增曲线

- a. 确认程序中是否设置了信号采集步骤：扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段
- b. 反应循环数不够：一般设置循环数为 40~50，但需要注意的是过多的循环会增加背景信号，降低数据可信度。
- c. 确认模板、引物是否降解：长时间未用的模板和引物应经过浓度测试，以排除引物降解的可能性。
- d. 模板投入量太低：提高模板投入量。

3. Ct 值出现太晚

- a. 扩增效率极低：优化反应程序和反应体系，重新设计引物。
- b. PCR 产物太长：一般设计扩增子长度为 70~200 bp。
- c. 反应体系中含有 PCR 抑制剂：一般由模板引入，加大模板稀释倍数或者重新制备模板。
- d. 模板投入量太低：提高模板投入量。

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 或水重复实验。反应体系在超净工作台上配制，减少气溶胶污染。
- b. 引物发生非特异扩增：如排除污染还是有扩增，重新筛选合适引物。

5. 重复性差

- a. 加样体积失准：使用校准的移液器，增大微量试剂体积。
- b. 定量 PCR 仪器孔间温度不一致：定期校准仪器。
- c. 阈值设置：对于不同板间的重复实验，请确保阈值设置一致。
- d. 模板投入量太低：提高模板投入量。