

NovoScript® Probe One-Step qRT-PCR Kit

目录号: E094-LPAA

产品描述:

NovoScript® Probe One-Step qRT-PCR Kit 是以RNA为模板的一步法定量PCR试剂。用基因特异性引物,以荧光探针进行扩增检测。在同一反应体系中,完成从反转录到qPCR检测的全部反应。本制品采用特殊工艺制造的HotStart Taq DNA聚合酶,并结合特别设计的反应缓冲液,对复杂模板(RNA病毒、疫苗等)能进行有效扩增,特异性高,能够在更广的范围内进行准确定量。

产品特点:

- 特异性高、灵敏度好:采用特殊工艺制造的HotStart Taq DNA聚合酶进行PCR反应,具有更高扩增效率和扩增灵敏度。
- 抗逆性能良好:独特的反应缓冲体系,使其能适应各种复杂类型模板的扩增。
- 反转录和qPCR反应在一管内完成,不需要额外的开管和移液操作,降低污染风险,提高检测通量。

使用建议:

使用时请上下颠倒轻轻混合,避免起泡,并轻轻离心后使用。反应液的配制、分装请使用新的(无污染的)枪头、Microtube等,尽量避免污染。

ROX I校准的Real Time PCR仪有:

ABI 5700/7000/7300/7700/7900/7900 HT Fast; ABI StepOne/StepOnePlus及其他仪器。

用ROX II校准的Real Time PCR仪有:

ABI 7500/7500 Fast; ABI ViiA7; ABI Q6;ABI Quant Studio 6/7 Flex; Stratagene MX4000/MX3500P/MX3000P及其他仪器。

不需要用ROX校准的Real Time PCR仪有:

Bio-Rad CFX96/CFX 384/iCycler iQ5/ iQ /My iQ5/MiniOpticon/Opticon/Opticon /Chromo4; Eppendorf MasterCyclerrealplex/ realplex 2s。

Cepheid SmartCycler; Illumina Eco qPCR;

Roche Applied Science LightCycler 480;

Thermo Scientific PikoReal Cycler;

Qiagen/Corbett Rotor-Gene Q/Rotor-Gene 3000/ Rotor-Gene 6000及其他仪器。

保存温度: $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

产品包装:

产品组成	A 包装	B 包装
5×NovoScript® Probe One-Step qRT-PCR SuperMix	400μl	1ml×2
NovoScript® RT Enzyme Mix	100μl	500μl
RNase Free Water	1ml	1ml×5
ROX Reference Dye I (ROX I)	50μl	200μl
ROX Reference Dye II (ROX II)	50μl	200μl

常用反应体系 (20μl):

5×NovoScript® Probe One-Step qRT-PCR SuperMix	4μl
NovoScript® RT Enzyme Mix	1μl
上游引物	0.2-1.0μM (终浓度)
下游引物	0.2-1.0μM (终浓度)
探针 10μM	0.4μl
ROX (请根据机器型号选择)	0.4μl
RNA 模板	1pg~1μg
RNase Free Water	至 20μl

常用 PCR 循环*:

*两步法可获得高特异性,三步法可获得高扩增率。

两步法扩增程序:

42°C,	5min;
95°C,	10s;
40 次循环	95°C, 5s; 60°C, 40s

三步法 PCR 扩增程序:

42°C,	5min;
94°C,	10s;
40 次循环	95°C, 15s; 50-60°C, 20 s; 72°C, 30s

注意事项:

- 1) 确保所用试剂中无RNA酶污染
- 2) 为保证反应有效进行,需使用高质量的 RNA 模板。

Q&A:

Q: 无 Ct 值出现

A:

- 1) 检测荧光信号的步骤有误: 一般染料法采用 72℃延伸时采集, 探针法则一般在退火结束时或延伸结束采集信号。
- 2) ROX 使用错误或者加量有偏差: 当 ROX 浓度太低或太高时, 都会影响机器修正后显示的荧光值, Ct 值会显示为 unknown 或空白, 可以根据仪器的类型选择合适的 ROX 类型 (I 或 II), 并严格按照 1: 50 的比例添加。
- 3) 引物或探针降解: 可通过电泳检测其完整性。
- 4) 模板量不足: 对未知浓度的样品应从系列稀释样本的最高浓度做起。
- 5) 模板降解: 避免杂质的引入及反复冻融, 必要时可以重新制备模板。

Q: Ct 值出现过晚(Ct>38)

A:

- 1) 扩增效率低, 反应条件不够优化: 设计更好的引物或探针; 适当降低退火温度; 改为三步法扩增。
- 2) PCR 各种反应成分降解或上样量不足: 更换试剂或加大上样量, 重复实验。
- 3) PCR 产物太长: 一般采用 80bp~150bp 的产物长度。
- 4) 热启动时间过短, 酶活性中心没有完全暴露, 活性发挥受到了影响: 建议热启动时间不低于 1 分钟。

Q: 扩增曲线异常, 如断裂或者锯齿状曲线?

A:

- 1) ROX 使用错误或者加量有偏差: ROX 浓度太低或太高时, 机器对荧光值进行修正后会产生断裂的曲线, 可根据说明书进行调整。
- 2) 分析数据时通道选择不正确, 如没有在 PCR mix 中加入 ROX, 但分析时在仪器设置中选择了 ROX 选项, 应根据反应的具体操作情况选择合适的通道。
- 3) 模板的浓度太高/降解或荧光染料发生了降解: 建议更换模板或 mix。
- 4) 反应管内有气泡: 混匀后离心, 避免气泡的残留。
- 5) 程序设置时间不当: 适当延长延伸时间 (40~60 秒), 充分收集荧光信号。

Q: 标准曲线线性关系不佳

A:

- 1) 加样存在误差, 导致标准品不呈梯度: 重新加样并重复实验。
- 2) 标准品出现降解: 应避免标准品反复冻融, 或重新制备并稀释标准品。
- 3) 引物或探针不佳: 重新设计更好的引物和探针。
- 4) 模板中存在抑制物, 或模板浓度过高: 更换模板或提高模板稀释倍数。

Q: 负对照有信号

A:

- 1) 引物设计不够优化: 应避免引物二聚体和发夹结构的出现。
- 2) 引物浓度不佳: 适当降低引物的浓度, 并注意上下游引物的浓度配比。
- 3) 模板有基因组的污染: RNA 提取过程中避免基因组 DNA 的引入, 可以稀释模板的浓度或者更换模板。
- 4) 反应体系污染: 更换 mix、水或者引物等, 避免交叉污染。

Q: 溶解曲线不止一个主峰

A:

- 1) 引物浓度过高或者设计不够优化: 应降低引物浓度或者重新设计引物, 避免产生引物二聚体。
- 2) 体系被污染: 更换试剂后重复实验。
- 3) 反应条件不够优化, 引起非特异性扩增: 设计特异性更高的引物或探针; 适当提高退火温度; 改为三步法扩增。

Q: 同一试剂在不同仪器上产生不同的曲线, 如何判断?

A: 判断标准: 扩增效率, 灵敏度, 特异性。如果扩增效率在 90%~110%, 都是特异性扩增, 可以把数据用于分析。

Q: 溶解曲线中, Tm 不出现在 80 度左右是怎么回事?

A: 扩增片段 100bp 左右的, 一般应该出现在 80 度左右。如果低于此温度出现, 可能是模板降解。

Q: 溶解程序可否不加?

A: 如果扩增效果好, 特异性高, 可以选择不加溶解程序 (建议加上)。此外, 不同的机型对应不同的溶解曲线设置程序, 可根据机型进行相应的设置。

Q: 扩增反应体系 5ul, 扩增效率低, 是什么原因?

A: 反应体系太小, 各种因素的影响相对较大, 比如引物浓度、模板浓度及金属离子等都会影响扩增效率。