

NovoStart® Universal Fast SYBR qPCR SuperMix

目录号：E401

01/ 产品描述

本制品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行快速 Real Time PCR 的 2×浓度预混型试剂，PCR 反应液的配制十分简单方便。使用突变型 Taq DNA 聚合酶，结合精心优化的反应 Buffer，可有效抑制低温下的非特异性扩增，实现快速 PCR 反应，并且能够在宽广的动态定量区域内对靶基因进行准确、快速、可重复的定量检测。并且，本制品中含有特定的 Universal ROX Passive Reference Dye，适应于所有 qPCR 仪器，无需在不同仪器上配备不同浓度的 ROX，只需在配制反应体系时加入引物和模板即可进行扩增，方便快捷。

02/ 产品特点

- 快速：**实现快速荧光定量，相较于传统 qPCR，反应时间减少 50%左右；
- 高特异性：**采用新型工艺制备抗体修饰的 HotStart Super Taq DNA 聚合酶，无需热启动即可进行 PCR 反应，大大提高 PCR 扩增的特异性；
- 高效：**Novoprotein 精心配制的 RealTime PCR 专用 2×SuperMix，预混 Universal ROX Passive Reference Dye，可适配市面上大部分仪器，加样更便捷高效，且具有更高的扩增效率和扩增灵敏度。

03/ 使用建议

- 使用：**请上下颠倒混合均匀，避免起泡，并经轻微离心后使用。反应液的配制、分装请使用新的（无污染的）枪头、Microtube 等，避免污染。建议反应体积为 20~50μl。
- 引物设计：**一般为了增加灵敏度及扩增效率且抑制非特异性反应，扩增目标序列越短越好。建议扩增长度在 200bp 以下。

04/ 质量控制

经检测：所有组分均无核酸内切酶残留、核酸外切酶残留、及 RNase 残留。

05/ 储存条件

-20°C±5°C避光储存，避免反复冻融。

06/ 产品包装

产品组成	E401-01A	E401-01B
2×NovoStart® Universal Fast SYBR qPCR SuperMix	1ml×5	1ml×25
RNase Free Water	1ml×5	1ml×23

本产品含有 Universal ROX Passive Reference Dye，适配于多种仪器，无需在不同仪器上调整 ROX 浓度。

07/ 操作说明

1. 常用反应体系（20μl）

2×NovoStart® Universal Fast SYBR qPCR SuperMix	10μl
上游引物	0.2-1.0μM（终浓度）
下游引物	0.2-1.0μM（终浓度）
模板	1-2μl
RNase Free Water	至 20μl

2. 反应程序

快速qPCR程序：

反应阶段	循环数	温度	时间
预变性	1	95°C	30s*
变性	35-45	95°C	5s
退火/延伸		60°C**	10-15s***
熔解曲线	使用仪器默认熔解曲线采集程序****		

常规qPCR程序：

反应阶段	循环数	温度	时间
预变性	1	95°C	30s*
变性	35-45	95°C	5s
退火/延伸		60°C**	30s
熔解曲线	使用仪器默认熔解曲线采集程序****		

*该预变性条件适合绝大多数扩增反应，如模板结构复杂，可将预变性时间延长至 3-5 min 以提高预变性效果。

**建议采用快速 qPCR 反应程序，退火温度请以 58-62°C作为设定范围的参考，发生非特异性反应时，可提高退火温度。若因使用 Tm 值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行常规 qPCR 扩增，退火温度请以 56-64°C的范围作为设定参考。

***对于 200 bp 以内的扩增子，延伸时间可设为 10 s；超过 200 bp 时，推荐延伸时间≥15 s。

****融解曲线分析请以所使用的荧光定量 PCR 仪推荐的程序进行设定，由于仪器采集程序区别较大，在此不做推荐。

08/ 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°C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: 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: 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: 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。

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。