

描述: 由于 PCR 对核酸的扩增效率极高, 在诊断 PCR 实验中, 非常容易造成移液器、台面、PCR 仪、空气等气溶胶污染。当实验环境被污染后, 会导致阴性样本的假阳性结果。在该 Probe qPCR Mix 中, 将 dNTP 中的 dTTP 全部更换为 dUTP, 从而使得扩增后的 PCR 产物中包含 dU 碱基。在随后的实验中, 含有气溶胶污染的 dU PCR 产物, 将被本试剂中的 UNG 糖基化酶降解, 从而去除了气溶胶的污染效应, 本试剂中的 UNG 酶在 37℃ 孵育 2 分钟, 即可消除高达 10 万个 Copy 的核酸污染物。

制品中的 Fast Taq DNA 聚合酶采用专有的热启动技术确保 55℃ 以下没有任何活性, 因此可在室温建立反应体系。Fast Taq DNA 聚合酶具有卓越的扩增速度, 因此满足快速 PCR 程序, 通常在 30min 以内可以完成扩增反应。同时该聚合酶具有耐受杂质的能力, 同样适用于粗制核酸样本的扩增反应。

5×Fast One-Step RNA Probe qPCR Mix (UNG) 是以 RNA 为模板, 进行一步法 qPCR 的专用试剂, 它是一种将热启动 Fast Taq DNA 聚合酶、MLV 反转录酶、Rnase Inhibitor、UNG 酶、反应 Buffer、dUTP/NTP Mixture 等试剂预的 5×浓度的单组分预混试剂。进行实验时, PCR 反应液的配制十分方便简单, 只需加入引物、探针、模板、水即可。该制品不含有 ROX 校正染料, 适用于各种荧光标记探针, 并且适用于各种定量 PCR 机型。

包装

规格	250T	1000T
5×Fast One-Step RNA Probe qPCR Mix (UNG)	1 ml	1 ml×4

储存:

- (1) 长期保存, 请避光置于 -20℃ 或 -70℃ 可保存 3 年。
- (2) 经常使用, 融化后可置于 4℃, 可保存 1 年。

操作方法

1. 进行 RNA 的 One-Step qPCR 检测

进行 RNA 的 qPCR 检测时, 检测模板为 RNA, 在反转录酶的作用下, 由下游引物进行反转录反应, 反转录反应完毕后获得 cDNA, 再启动 PCR 的扩增, 并对 cDNA 进行扩增, 整个过程在一种试剂中一步完成 (One-Step qPCR)。

按照如下组分配制 20 μl PCR 反应体系:

	终浓度
5×Fast One-Step RNA Probe qPCR Mix(UNG)	4 μl 1×
PCR Forward Primer(10 μM)	0.4 μl 0.2 μM
PCR Reverse Primer(10 μM)	0.4 μl 0.2 μM
Probe (10 μM)	0.2 μl 0.1 μM
RNA 模板 (10pg-500ng)	0.5~2 μl
ddH ₂ O	Up to 20 μl

注意: (1) 通常使用 0.4 μl 的扩增引物可获得理想的扩增结果, 必要时可在 0.2~0.8 μl 之间进行调整。

(2) 探针的浓度在 50~250 nM 之间调整; 在双探针检测时通常探针用量减半, 扩增引物浓度保持不变。

(3) qPCR 灵敏度极高, 建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。建议将模板稀释后加入反应体系中, 这样可以有效提高实验的重复性。

2. RNA 的 One-Step qPCR 反应程序如下:

Stage 1:	37℃	2min (消化污染物)
Stage 2:	55℃	10min (反转录获得 cDNA)
Stage 3:	95℃	30s
Stage 4:	95℃	5s
	60℃	20s (收集荧光信号) 40 cycles

注意: (1) 预变性 30s 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 min。

(2) 对于 200 bp 以内的片段, 延伸时间最短可设为 10 sec; 超过

200 bp 时, 推荐延伸时间为 20-30 sec。

3. 反应结束后确认 Real-Time PCR 的扩增曲线。

探针设计原则

1. 探针位置尽可能地靠近上游引物。
2. 探针长度应在 15-45bp (最好是 20-30bp), 以保证结合特异性。
3. 探针 Tm 值在 65-70°C, 通常比引物 Tm 值高 5-10°C (至少要 5°C), GC 含量在 40%—70%
4. 探针的 5'端应避免使用 G, 因为 5'G 会有淬灭作用。
5. 整条探针中, C 的含量要明显高于 G 的含量; 避免出现重复的碱基。
6. 为确保引物探针的特异性, 最好将设计好的序列 blast 中核实一次, 如果发现有非特异性互补区, 建议重新设计引物探针。
7. 尽量避免出现重复的碱基, 尤其是 G 碱基, 应避免出现 4 个或 4 个以上的 G 重复出现。

常见问题与解决方案

1. 扩增曲线异常

- (1) 扩增曲线不平滑: 模板浓度太低或模板纯度低, 换用高质量模板。
- (2) 扩增曲线断裂或下滑: 模板浓度较高引起, 基线的终点值大于 CT 值。减小基线终点(CT 值-4), 重新分析数据。
- (3) 个别扩增曲线突然下降: 反应管内留有气泡, 配好反应体系上机前要进行离心, 避免管里气泡的出现。

2. 反应结束无扩增曲线

- (1) 确认程序设置是否正确: 是否设置了收集信号步骤, 两步法扩增程序一般设置在退火延伸阶段, 三步法设置在 72°C 延伸阶段。
- (2) 模板降解或浓度偏低: 如模板降解需重新制备新的模板, 浓度偏低可通过减少稀释度重复实验, 一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- (3) 确认引物是否降解: 长时间未用的引物应先通过 PAGE 电泳检测完整性, 以排除其降解的可能。

3. CT 值偏大

- (1) 扩增效率低: 优化反应条件包括引物序列和引物浓

度, 或尝试三步法扩增程序。

- (2) 模板降解或浓度偏低: 如模板降解需重新制备新的模板, 浓度偏低可通过减少稀释度重复实验, 一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。

- (3) PCR 产物太长: 推荐 PCR 产物长度为 100- 200 bp。

- (4) 体系中存在 PCR 抑制剂: 一般为模板带入, 将模板加

大倍数稀释后再进行扩增, 或重新制备模板。

4. 阴性对照出现明显扩增

- (1) 反应体系污染: 用气溶胶去除剂 (HaiGene, A6001) 处理实验台面和环境, 更换新的 Mix、水、引物再进行实验。

- (2) 引物二聚体的出现: 配合融解曲线进行分析。

5. 绝对定量时标准曲线线性关系不佳

- (1) 模板浓度太高: 提高模板稀释倍数, 采用专用稀释液。
- (2) 某个标准品降解: 重新制备标准品再进行实验。
- (3) 加样误差: 提高模板稀释倍数后再进行实验。

6. 实验重复性差

- (1) 加样体积导致: 提高模板稀释倍数, 用准确的移液器。
- (2) 定期校准 qPCR 仪器和移液器。
- (3) 模板浓度太低: 模板浓度越低, 重复性越差, 减少模板稀释度或提高加样体积。