# NovoStart® Fast SYBR qPCR SuperMix

**目录号：YZ-302010**

## 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。本制品使用突变型 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，并且能够在宽广的范围内对靶基因进行准确、快速、可重复的定量检测。

## 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，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，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℃避光储存，避免反复冻融。

## 06/产品包装：

| 产品组成 | YZ-302010A | YZ-302010B |
|---|---|---|
| 2×NovoStart® Fast SYBR qPCR SuperMix | 1ml×5 | 1ml×25 |
| RNase Free Water | 1ml×5 | 1ml×23 |
| ROX Reference Dye I (ROX I) | 200μl | 1ml |
| ROX Reference Dye II (ROX II) | 200μl | 1ml |

## 07/常用反应体系（20μl）：

| | |
|---|---|
| 2×NovoStart® 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 |
| ROX（需根据机器型号选择） | 0.4μl |
| RNase Free Water | 至 20μl |

最终解释权所有 © 上海远赞生命科学有限公司，保留一切权利

上海远赞生命科学有限公司
Shanghai Yuanzan Life Science Co.，Ltd.
Add: 上海市浦东新区康威路 795 弄 6 号
E-mail:yzsm@yuanzan.com · http://www.yuanzan.com

## 08/适用仪器

### 用ROX I校准的Real Time PCR仪有：

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

### 用ROX II校准的Real Time PCR仪有：

ABI: 7500/7500 Fast/ViiA7/QuantStudio 3,5,6 Flex,7 Flex12k 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 iQ/ iQ5/MyiQ/MiniOpticon/Opticon/Opticon2/Chromo4；

Eppendorf: MasterCycler ep realplex/realplex 2s；

Cepheid: SmartCycler；

Illumina: Eco qPCR；

Roche Applied Science: LightCycler480/LightCycler2.0/Lightcycler96；

Thermo Scientific: PikoReal Cycler；

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

## 09/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℃ | 30s |
| 变性 | 35-45 | 95℃ | 5s |
| 退火/延伸 | | 60℃ | 10-15s |

### 常规 qPCR 程序：

| 反应阶段 | 循环数 | 温度 | 时间 |
|---|---|---|---|
| 预变性 | 1 | 95℃ | 30s |
| 变性 | 35-45 | 95℃ | 5s |
| 退火/延伸 | | 60℃ | 30s |

## 10/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。

最终解释权所有 © 上海远赞生命科学有限公司，保留一切权利

上海远赞生命科学有限公司
Shanghai Yuanzan Life Science Co.，Ltd.
Add: 上海市浦东新区康威路 795 弄 6 号
E-mail:yzsm@yuanzan.com · http://www.yuanzan.com

**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。

**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。

最终解释权所有 © 上海远赞生命科学有限公司，保留一切权利

上海远赞生命科学有限公司
Shanghai Yuanzan Life Science Co.，Ltd.
Add: 上海市浦东新区康威路 795 弄 6 号
E-mail:yzsm@yuanzan.com · http://www.yuanzan.com