

Evaluation of RT-qPCR protocols with

Volcano3G[®]

RT-PCR

Probe 2x

Master Mix

分子诊断技术手册

介绍

Volcano3G® RT-PCR Probe 2x Master Mix 预混液中包含一种独特的兼具反转录酶活性的工程化 Taq DNA 聚合酶，其极耐高温。配合预混液中 Taq DNA 聚合酶可完成高效的 RT-qPCR 扩增。两种酶均采用了基于适配体修饰的热启动技术，配合优化的预混液配方完成高灵敏、高效的扩增检测。

Volcano3G® 对于不同类型的 RT-qPCR 应用都是上佳之选。对于 RNA 模板，其预混液可完成真正的定量或快速检测¹²。该酶所固有的热稳定性及兼具的反转录酶活性，可以支持零步反转录 RT-qPCR³，或者传统的一步法 RT-qPCR。反转录步骤的反应温度可高达 58-70°C，甚至更高。

在 RT-qPCR 中使用 Volcano3G® 时，有多种程序体系可供选择，包括：循环 RT-qPCR、降落 RT-qPCR、包含高温反转录步骤的 RT-qPCR、以及无需单独反转录步骤的零步法 RT-qPCR。



方法

Volcano3G® RT-PCR Probe 2x Master Mix 可用于多重检测，在本实验的单个反应中，实现了四个靶基因的扩增。

实验以全细胞裂解物为模板，每组设三个复孔，在 ABI QuantStudio5 PCR 仪上，分别采用了四种反应程序 (如下表) 进行实验：

A) 循环 RT-qPCR

温度	时间	循环数
95°C	1 sec	10x
70°C	1 min	
95°C	5 sec	50x
66°C	30 sec	

B) 降落 RT-qPCR

温度	时间	循环数
95°C	1 sec	10x
70°C → 66°C	1 min	
95°C	5 sec	50x
66°C	30 sec	

C) 包含高温反转录步骤的 RT-qPCR

温度	时间	循环数
70°C	15 min	1x
95°C	5 sec	50x
66°C	30 sec	

D) 不含单独反转录步骤的零步法 RT-qPCR

温度	时间	循环数
95°C	20 sec	1x
95°C	5 sec	50x
66°C	30 sec	

在更高温度下进行反转录，
有助于处理复杂样本（如基
质，RNA 二级结构），并
提升反应特异性。

结果

实验结果显示，循环 RT-qPCR 和降落 RT-qPCR Cq 值更小 (如图 2)，这两种反应程序的扩增曲线相似 (如图 1A 及 1B)。

用传统的 PCR 仪，循环反转录步骤可以让 cDNA 合成更可靠，并更早得到检测结果。另外，降落 RT-qPCR 可有效减少引物二聚体的形成、或非特异性结合的发生。在降落反转录步骤使用 Volcano3G® RT-PCR Probe 2x Master

Mix，可确保 cDNA 的高效合成以及靶基因的正确扩增。

应用包含高温反转录步骤的 RT-qPCR (图 1C) 或不含单独反转录步骤的零步法 RT-qPCR (图 1D)，相较于前两种程序的应用 (图 1A, 图 1B)，荧光信号值基本一致，Cq 循环值相对滞后 (图 2)，但反应时间上总体较短，更加满足快速 RNA 定性检测需求。

结论

- Volcano3G® RT-PCR Probe 2x Master Mix 是一种多功能预混液，适用于多种类型的 RT-qPCR 应用场景，可用于 RNA 的定量或定性检测。
- 在循环 RT-qPCR 或降落 RT-qPCR 反应程序中使用 Volcano3G® RT-PCR Probe 2x Master Mix 预混液，更有利于 RNA 的定量检测。而包含高温反转录步骤的 RT-qPCR 或不含单独反转录步骤的零步法 RT-qPCR 反应程序的应用，更加适合快速 RNA 定性检测需求。
- Volcano3G® RT-PCR Probe 2x Master Mix 高温稳定性极佳，可以在 58-70°C 甚至更高温度下进行反转录。

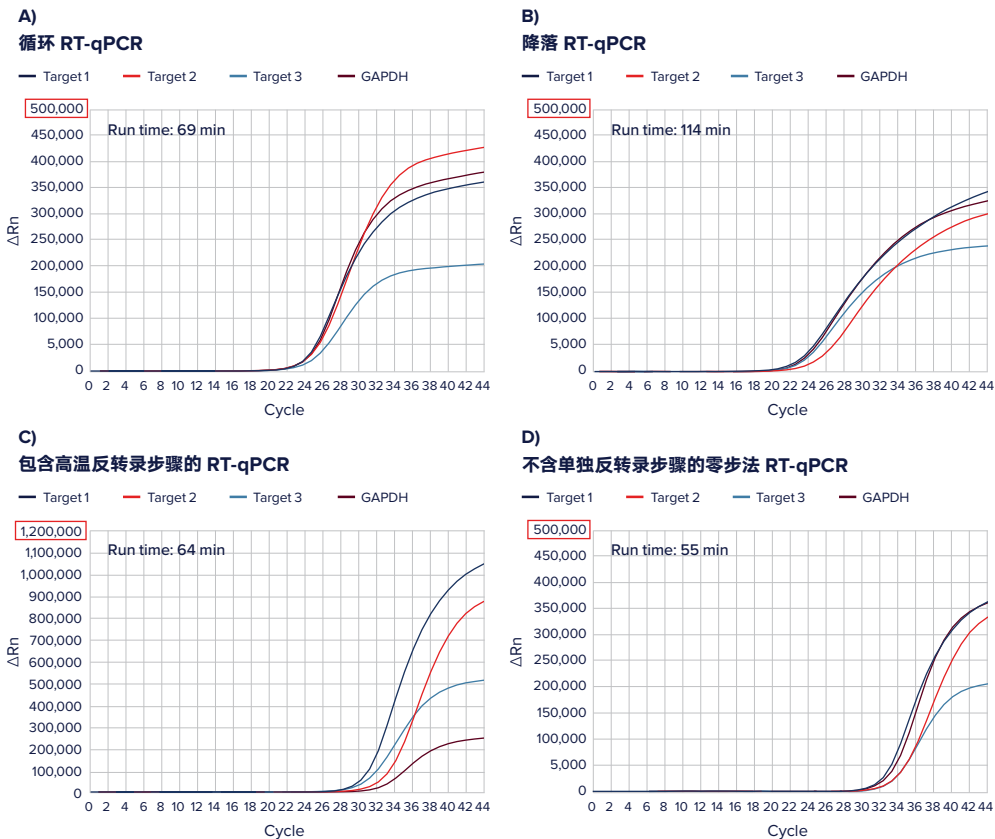


图 1: 基于不同反应程序的实验结果。扩增曲线的值为三个复孔的平均值。

- A) 循环 RT-qPCR
- B) 降落 RT-qPCR
- C) 包含高温反转录步骤的 RT-qPCR
- D) 不含单独反转录步骤的零步法 RT-qPCR

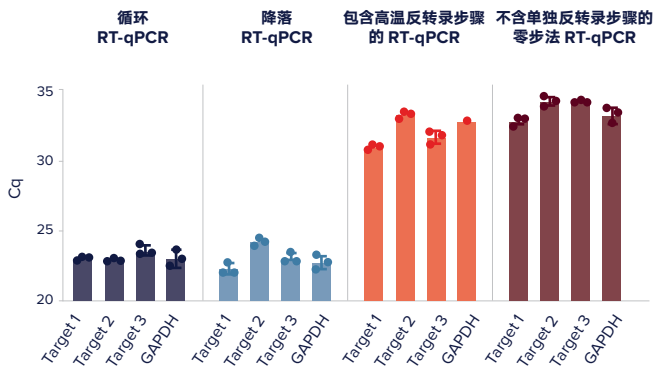


图 2: 不同反应程序下 RNA 模板扩增的 Cq 值。所有实验均以细胞裂解液为模板, 并设三个复孔。

文献:

1. Kuiper, J. W. P. et al. Detection of SARS-CoV-2 from raw patient samples by coupled high temperature reverse transcription and amplification. PLoS One 15, 1–13 (2020).
2. Schwaderer, J. et al. Pharmacological LRH-1/Nr5a2 inhibition limits pro-inflammatory cytokine production in macrophages and associated experimental hepatitis. Cell Death Dis. 11, (2020).
3. Chovancova, P., Merk, V., Marx, A., Leist, M. & Kranaster, R. Reverse-transcription quantitative PCR directly from cells without RNA extraction and without isothermal reverse-transcription: A 'zero-step' RT-qPCR protocol. Biol. Methods Protoc. 2, 1–6 (2017).

Medix Biochemica

更多产品信息:

cnmedixbiochemica.com

上海市闵行区浦江镇绿洲环路 10 号 6 幢 11 层

medixchina@medixbiochemica.com



myPOLS Biotec GmbH
Byk-Gulden-Str. 2 // 10, 78467 Konstanz,
Germany

Copyright © 11/2022 Medix Biochemica. All rights reserved.

Medix Biochemica 保留对本文件所述的任何产品进行更改和改进的权利。无需另行通知。