Version 4

Code No. AG11708

*Evo M-MLV*一步法 RT-qPCR 试剂盒（探针法）

Evo M-MLV One Step RT-qPCR Kit（Probe）

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

ACCURATE BIOLOGY 艾科瑞生物

➢ 产品概述

本产品是使用探针法进行 One Step RT-qPCR 专用的试剂盒，反转录和 qPCR 反应在同一管内完成，不需要额外的开管或移液加样的操作，操作简便、快捷，可有效降低污染风险。同时本产品使用了延伸能力强的 *Evo M-MLV* 反转录酶，整合热启动酶 *Pro Taq* HS 的优越性能，可以在短时间内高效合成 cDNA 并进行高效稳定的 qPCR 扩增。本产品可以对扩增产物进行实时监测，大大提高监测灵敏度，非常适合病毒 RNA 等微量 RNA 的检测。

➢ 产品组成

组分名称	AG11708 （250 rxns / 20 μl）
2X One Step RT-qPCR Buffer (Probe)*1	1.25 ml x 2 pcs
Pro Taq HS DNA Polymerase（5 U/μl）	100 μl
Evo M-MLV RTase Enzyme Mix*2	100 μl
RNase free water	1 ml x 3 pcs

*1：含有 dNTP Mixture、反应 Buffer。

*2：含有 *Evo M-MLV* RTase、RNase Inhibitor。

➢ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或-20℃冰袋运输

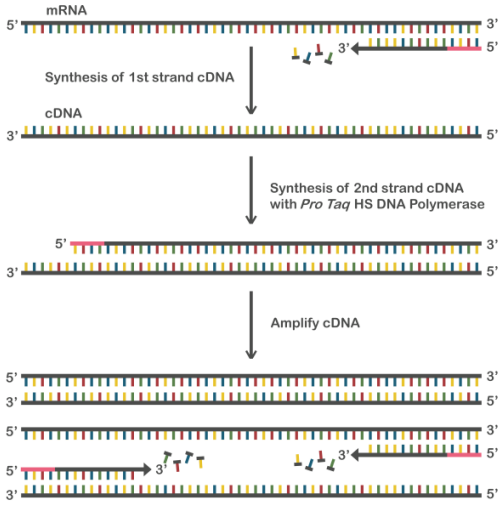
➢ 产品优势

1. 本产品是一步法 RT-qPCR 反应试剂盒，在单管内完成反转录与 qPCR 反应，简化操作，提高效率，可有效的降低多次操作污染的可能性。
2. 本产品采用了延伸能力强的 *Evo M-MLV* 反转录酶、性能优越热启动酶 *Pro Taq* HS 及优化的反应体系，具有特异性强、扩增效率高的特性。
3. 本产品可快速、准确的检测微量 RNA。
4. 本产品可用于多重探针检测。

➢ 实验原理

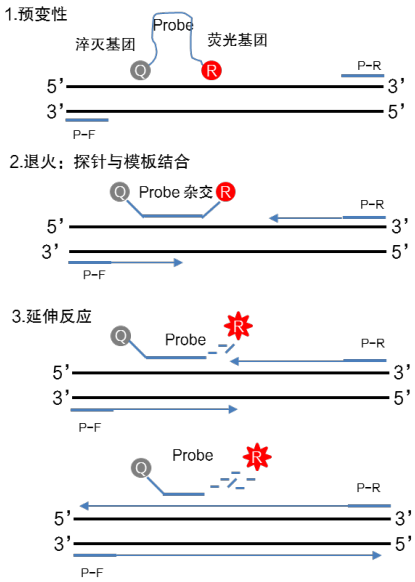
1. 一步法 RT-PCR 扩增原理

一步法 RT-PCR 是在单管中，RNA 首先通过逆转录酶反转录为 cDNA，然后在 DNA 聚合酶作用下以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增生成 DNA 的反应，如下图所示。



2. 荧光探针 qPCR 检测原理：

荧光探针检测所用的探针在 5' 端标记有荧光物质(如:FAM),3' 端标记有淬灭物质(如:BHQ),当探针保持完整时，5' 端荧光报告基团发射的荧光受 3' 端淬灭基团淬灭，不能发出荧光信号；但是当探针被分解后,5' 端荧光报告基团与 3' 端淬灭基团分离，释放荧光信号。



在 PCR 反应过程中，退火时荧光探针会与待检测模板杂交；延伸时，Taq DNA 聚合酶的 5' → 3' 外切酶活性可以分解杂交的荧光探针，使得 5' 端荧光报告基团游离出来，进而释放荧光信号。通过检测反应体系中的荧光信号强度，达到对目的基因进行定量分析的目的。

➢ 使用注意事项

- 请仔细阅读所用定量 PCR 仪器设备操作手册，根据仪器操作手册进行操作。
- 防止 RNase 污染，请保持实验区域洁净，实验所用的离心管、枪头等耗材均需 RNase-free 级别。
- *Evo M-MLV* RTase Enzyme Mix 和 *ProTaq* HS DNA Polymerase 甘油浓度较高，使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液枪轻轻吸打混匀（避免起泡），再进行使用。

- 所有反应混合液需要在冰上配制。需要同时进行数次反应时，应先配制各种试剂的混合液，然后分装到每个反应管中。
- 2X One Step RT-qPCR Buffer (Probe) 溶解后如有不溶物请充分混匀至沉淀全部消失。
- 本产品中未配有 ROX Reference Dye，如果反应中需要添加 ROX Reference Dye 用以校正孔间荧光信号值误差，可选择如下产品配合使用：（请根据仪器设备说明书要求确定是否添加 ROX Reference Dye）

  ROX Reference Dye (20μM) (AG11703)

  ROX Reference Dye (4μM) (AG11710)

  注：上述 ROX Reference Dye 产品在反应体系中建议 50X 稀释使用（例如，50μl 反应体系中添加 1μl ROX Reference Dye），如果实验结果不理想，可调整 ROX Reference Dye 添加量。
- 本产品中不含探针。
- 使用本产品进行反转录反应时必须使用特异性引物，Random Primer、Oligo dT Primer 不能使用。

➢ 实验前准备

1) 试剂 & 耗材：

Primer、探针引物、RNase-free 1.5 ml 离心管、定量 PCR 管、枪头、冰浴或冰盒、移液器

2) 仪器：

	仪器
无需添加	(Bio-Rad) IQ5, CFX96™, CFX384™, CFX Connect™, MJOpticon, Opticon 2; (Cepheid) SmartCycler® System, Smart Cycler II System; (Roche) LightCycler® 2.0, 480, 96; (Qiagen) Rotor-Gene® Q, 3000, 6000; (Bioer) Line-Gene; (Eppendorf) Mastercycler ep realplex; (Analytik Jena) qTOWER3; (TaKaRa) Thermal Cycler Dice™ TP700, TP760, TP900, TP960, TP950, TP970, TP980, TP990;
添加 AG11703（终浓度为 0.4μM)	(Thermo) ABI7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus;

添加 AG11710 **（终浓度为 0.08μM）**	(Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™ 7, QuantStudio™ 3 / 5, QuantStudio™ 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™ Dx; (Agilent) Mx3000P™, Mx3005P™, MX4000™;

➢ 操作方法

（以 ABI 7500 Real-Time PCR System 为例）

1）配制 PCR 反应液[*1]

组分名称	20μl 体系	50μl 体系
2X One Step RT-qPCR Buffer (Probe)	10μl	25μl
Pro Taq HS DNA Polymerase（5 U/μl）	0.4μl	1μl
Evo M-MLV RTase Enzyme Mix	0.4μl	1μl
Primer F (10μM)[*2]	0.4μl	1μl
Primer R (10μM)[*2]	0.4μl	1μl
Probe[*3]	0.1 ~ 0.8μM	0.1 ~ 0.8μM
ROX Reference Dye (4μM)[*4]	0.4μl	1μl
Template[*5]	≤100 ng	≤200 ng
RNase free water	up to 20μl	up to 50μl

*1：请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。

*2：引物通常使用终浓度为 0.2μM，也可以在 0.1 ~ 1.0μM 范围内调整。

*3：使用的探针浓度，与使用的定量 PCR 仪、荧光标记物质种类有关，请参照仪器说明书及荧光探针的具体使用要求调整。通常探针终浓度可在 0.1 ~ 0.8μM 范围内进行调整。

*4：如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准，请按照仪器推荐量添加。若不需要使用 ROX 的 PCR 仪，ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。

*5：在 20μl 体系里，RNA 模板添加量通常不高于 100 ng；在 50μl 体系里，RNA 模板添加量通常不高于 200 ng。必要时可以进行稀释，以确定合适的模板添加量。

RT-qPCR 反应条件[*1]（两步法 PCR 反应程序）

步骤	温度	时间	循环数
Step 1	42℃[*2]	5min[*2]	1
Step 2	95℃	30 sec[*3]	1
Step 3	95℃	5 sec	40
	60℃[*4]	30 sec[*4]	

*1：请参照仪器操作手册设置反应条件。

*2：通常 42℃、反应时间 5 min 可以得到较好的结果，也可根据具体实验情况，尝试调整反转录反

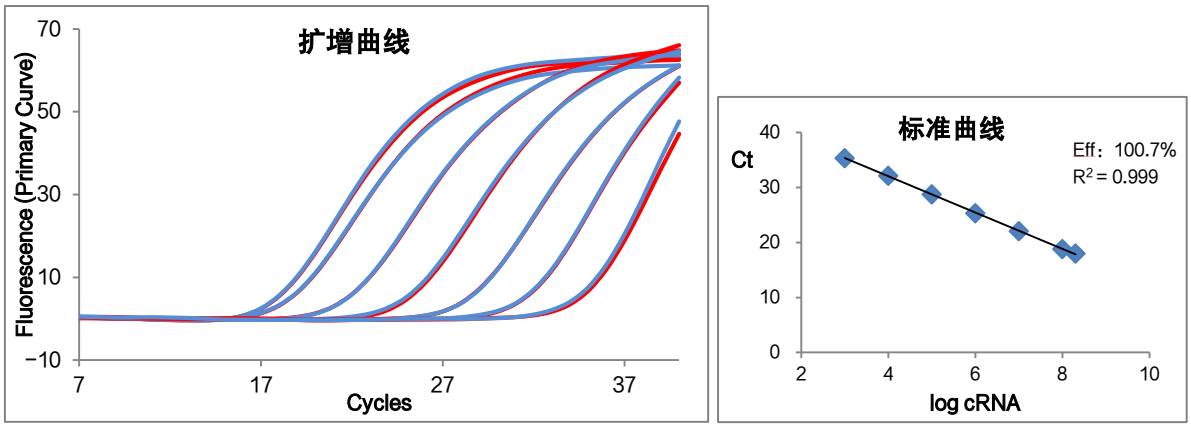
应温度和时间，以得到理想的实验结果。

*3：预变性时间通常设定为 30 sec，如果模板变性困难，可以延长预变性时间至 1~2 min。

*4：PCR 扩增产物通常设计在 300 bp 以下，扩增延伸反应条件设定为 60℃、30 sec 时通常情况下可以满足要求；如需提高反应特异性，可适当提高退火温度；如需提高扩增效率，或者 PCR 扩增产物较长，则可将反应延伸时间适当延长，同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。

➢ 实验例

1. 使用本产品对 293T 细胞 RNA（200 ng、100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg）为模板，进行 One Step RT-qPCR 检测 Human *β -actin* Gene。



结果如上图所示：1、扩增效率为 100.7%，R^2=0.999；

2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量，200 ng ~ 1 pg Total RNA 进行 RT-qPCR 反应的扩增曲线呈现良好的线性关系。

➢ 产品注意事项

1. 合适的模板加入量及浓度

❖ 模板量低：导致扩增结果 Ct 值较大，荧光信号值较低，RT-qPCR 反应扩增效率较低，反应结果重复性较差，扩增曲线形状异常。可适当提高模板反应量。

❖ 模板量高：导致 Ct 值太小、扩增荧光信号值太高，扩增曲线形状异常；可适当降低模板量。

❖ 模板浓度高：模板取液量体积较小，导致模板加样体积不准，实验重复性差；可将模板适当稀释后加样。

2. 高纯度及完整的模板

❖ 模板不纯：①含有抑制 RT-qPCR 反应的物质，会导致扩增结果 Ct 值较大，扩增效率较低。②RNA 模板中混有基因组 DNA，会导致反应特异性不好，熔解曲线出现多峰。可对模板重新提纯。

- ❖ 模板降解：导致扩增结果 Ct 值较大，RT-qPCR 反应扩增效率较低。可重新制备模板，重复试验。

3. 合适的引物浓度

- ❖ 引物浓度低：导致反应效率低，Ct 值较大。可尝试提高 RT-qPCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度高：导致反应特异性不好，熔解曲线出现多峰。可适当降低引物浓度。
- ❖ 引物特异性不好：导致反应特异性不好，易形成了引物二聚体，熔解曲线出现多峰。建议重新设计引物。
- ❖ 引物完整性不好：可能会导致无扩增曲线，可通过 PAGE 电泳确认引物的完整性，如引物有降解，建议更换引物。
- ❖ 引物设计的原则：
  - ① 引物一般是 15 ~ 30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40 ~ 60%之间。
  - ② 建议正反向引物 Tm 值在 50 ~ 70℃，两引物 Tm 值相差不超过 5℃。
  - ③ 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
  - ④ 引物 3’端避免出现发夹结构。
  - ⑤ 减少引物之间的互补序列，最好不要超过 4 个碱基连续互补序列。

4. 合适的探针引物

- ❖ 探针引物浓度过高：可能会导致背景信号值偏高；若进行多重定量 PCR 检测，易造成探针之间相互干扰。
- ❖ 探针引物浓度过低：可能会导致荧光信号值偏低，Ct 值偏大。
- ❖ 探针引物设计的原则：
  - ① 探针引物长度一般 18 ~ 40 bp。
  - ② 探针 5’端尽量避免使用 G 碱基，因其具有淬灭荧光的能力。C 碱基比 G 碱基多的探针效果更好，如果 C 小于 G，选择其互补链。
  - ③ 应避免探针中多个重复的碱基出现，尤其是要避免 4 个或超过 4 个的 G 碱基出现。
  - ④ 探针引物的 Tm 值通常比扩增引物 Tm 值高 10℃，一般控制在 65℃ ~ 70℃左右。
  - ⑤ 探针引物尽量靠近扩增上下游引物，但不可与之重叠。

5. 合适的退火温度

- ❖ 退火温度过低：导致反应特异性不好，出现非特异性扩增，形成引物二聚体，熔解曲线出现多峰。可适当提高退火温度。
- ❖ 退火温度过高：导致扩增效率低，无扩增曲线。可适当降低退火温度。

6. 实验细节

- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡。
- ❖ 确认 ROX 与仪器是否匹配，ROX 使用前确保完全融化并混匀。

- ❖ 检查反应程序，确保反应程序设置正确。

7. 防止 RNase 污染措施

- ❖ 实验过程中应佩戴一次性的口罩、手套。
- ❖ One Step RT-qPCR 实验所用耗材，如枪头、定量 PCR 管等建议使用 RNase-free 级别的耗材。
- ❖ RNA 实验用的试剂专用，RNA 的添加建议在专门的区域，避免混用后交叉污染。

➢ 附录：三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
Step 1	42℃	5 min	1
Step 2	95℃	30 sec	1
Step 3	95℃	5 sec	40
	55℃	30 sec	
	72℃	30 sec	
Step 4	Dissociation stage		