

Version 1

Cat No. AG11715

Evo M-MLV 一步法

RT-qPCR 试剂盒Ⅲ（探针法）

Evo M-MLV

One Step RT-qPCR KitⅢ（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.



➤ 产品概述

本制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，操作简单、快捷，可有效降低污染风险。本制品的反转录酶与 buffer 经过优化，适用性广泛，尤其适合 GC 含量较高或具有复杂二级结构的 RNA 的扩增。本制品使用了延伸能力较强的 *Evo M-MLV* II 反转录酶，整合热启动 *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，非常适合病毒 RNA 等微量 RNA 的检测。

➤ 产品组成

组分名称	AG11715 (250 rxns / 20 μ l)
2X One Step RT-qPCR Buffer III (Probe) ^{*1}	1.25 ml x 2 pc
<i>Pro Taq</i> HS DNA Polymerase (5 U/ μ l)	100 μ l
<i>Evo M-MLV</i> RTase Enzyme Mix III ^{*2}	100 μ l
RNase free water	1 ml x 3 pc

*1: 含有 dNTP Mixture 与反应 buffer。

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

➤ 保存

保存温度：-20℃

运输温度：干冰或-20℃冰袋运输

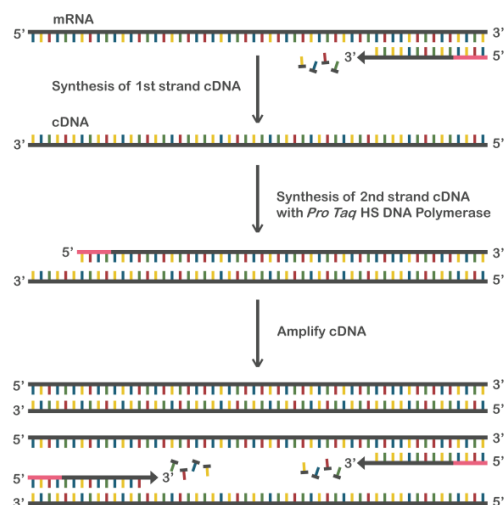
➤ 产品优势

1. 本制品是一步法 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. 本制品采用了延伸能力强的 *Evo M-MLV* II 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. 本制品可快速、准确的检测微量 RNA。
4. 适合 GC 含量较高或具有复杂二级结构的 RNA 的扩增。
5. 本制品可用于多重探针检测。

➤ 实验原理

1. 一步法 RT-PCR 扩增原理

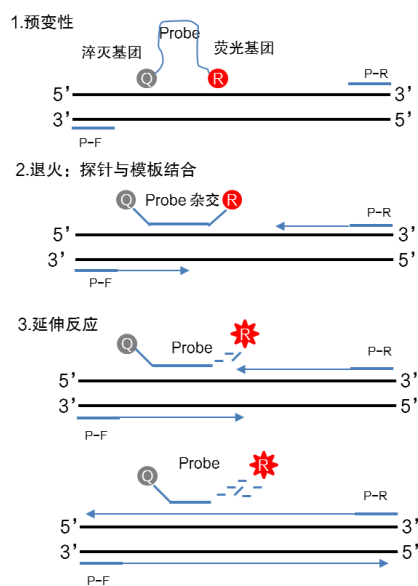
一步法 RT-PCR 是在单管中，RNA 首先通过逆转录酶反转录为 cDNA，然后在 DNA 聚合酶作用下以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增生成 DNA 的反应，如下图所示。



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-MLVRTase Enzyme Mix III* 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,并用移液枪轻柔吸打混匀(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 III (Probe) 溶解后如有不溶物请充分混匀至沉淀全部消失。
- 本制品中未配有 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 (20 μ M) (AG11703)
 ROX Reference Dye (4 μ M) (AG11710)
 注：上述 ROX Reference Dye 产品在反应体系中建议 50X 稀释使用（例如，50 μ l 反应体系中添加 1 μ l ROX Reference Dye），如果实验结果不理想，可调整 ROX Reference Dye 添加量。
- 本制品中不含探针。
- 使用本制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 ROX	(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;
添加 ROX (终浓度为 0.4 μ M)	(Thermo) ABI7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus;
添加 ROX (终浓度为 0.08 μ M)	(Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA7, QuantStudio 3 / 5, QuantStudio 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™Dx; (Agilent) Mx3000P, Mx3005P, MX4000;

➤ 操作方法

(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems 为例)

1) 配制 PCR 反应液

组分名称	20 μ 体系 ^{*1}	50 μ 体系 ^{*1}
2X One Step RT-qPCR Buffer III (Probe)	10 μ l	25 μ l
<i>Pro Taq</i> HS DNA Polymerase (5 U/μ l)	0.4 μ l	1 μ l
<i>Evo M-MLV</i> RTase Enzyme Mix III	0.4 μ l	1 μ l
Primer F ^{*2}	0.2 μ M	0.2 μ M
Primer R ^{*2}	0.2 μ M	0.2 μ M
Probe ^{*3}	0.1~0.8 μ M	0.1~0.8 μ M
ROX Reference Dye (4 μ M) ^{*4}	0.4 μ l	1 μ l
Template ^{*5}	< 100 ng	< 200 ng
RNase free water	up to 20 μ l	up to 50 μ l

*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 0.2 μ M, 也可以在 0.1~1.0 μ M 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 0.1~0.8 μ M 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。

*5: 在 20 μ l 体系里, RNA 模板添加量通常在 100 ng 以下, 必要时可以进行梯度稀释, 以确定合适的模板添加量。

2) RT-qPCR 反应条件^{*1} (两步法 PCR 反应程序)

	温度	时间	cycles
Step 1	42°C ^{*2}	5 min ^{*2}	1
Step 2	95°C	30 sec ^{*3}	1
Step 3	95°C	5 sec	40-45
	60°C	30 sec ^{*4}	

*1: 请参照仪器操作手册设置反应条件。

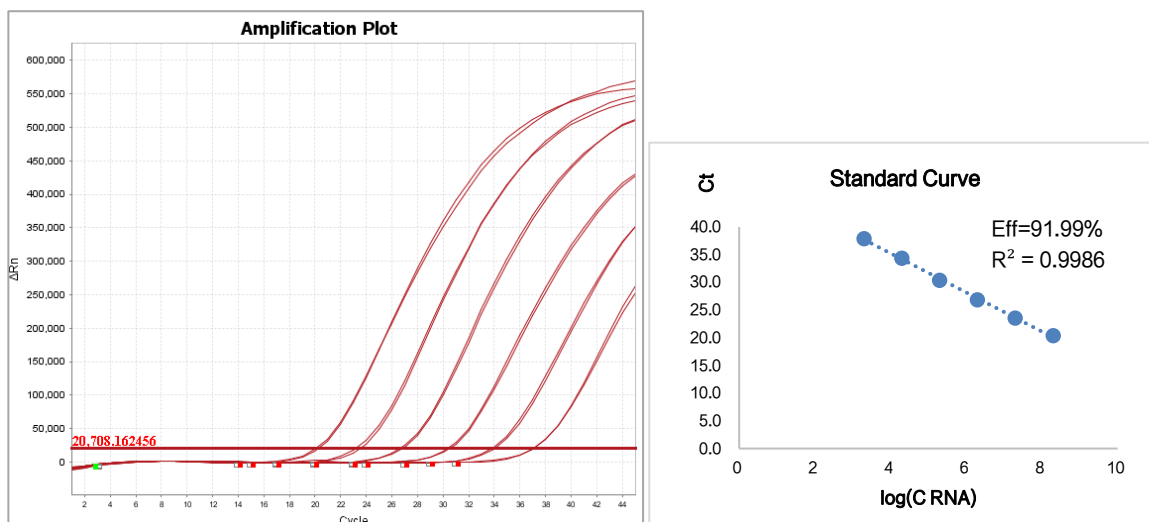
*2: 通常 42°C、反应时间 5 min 可以得到较好的结果, 也可根据具体实验情况, 尝试调整反转录反应温度和时间, 以得到理想的实验结果。

*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°C、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

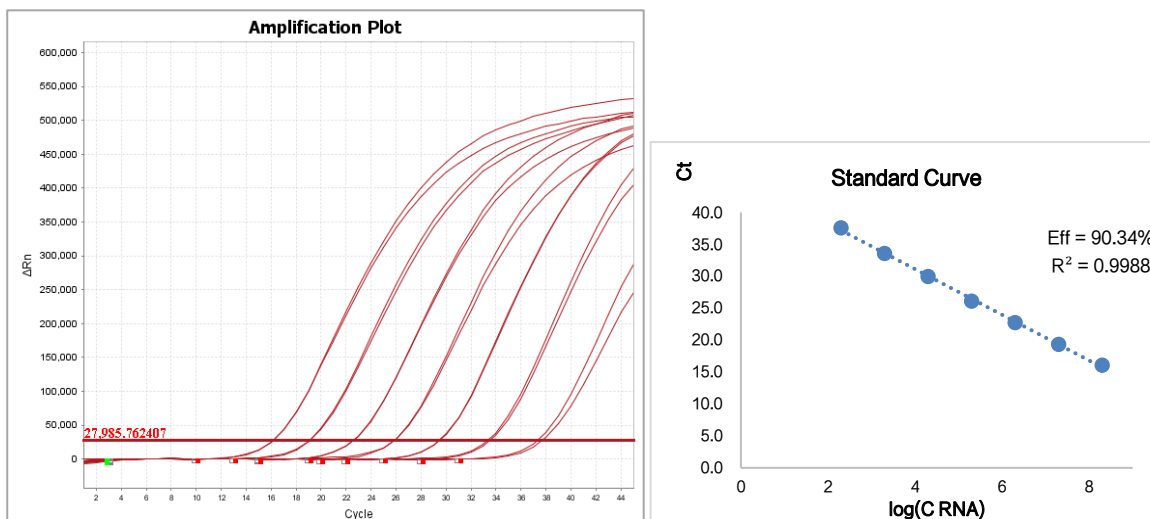
1. 以 Human Total RNA (200 ng~200 fg) 为模板，使用本试剂盒进行 One Step RT-qPCR 检测 *TFRC* Gene (GC 含量 38%) 。



结果如上图所示：1、扩增效率为 91.99%， $R^2=0.9986$ ；

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

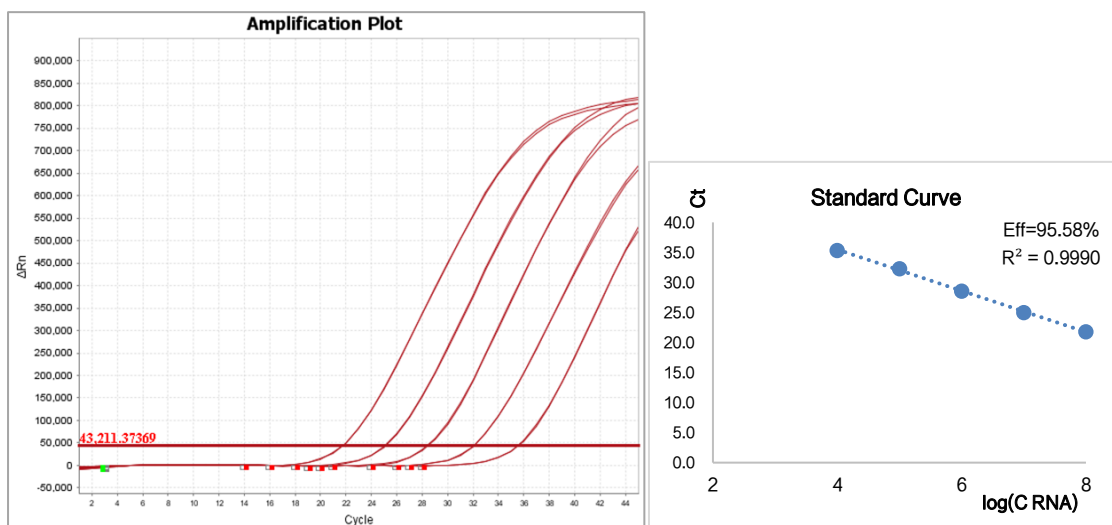
2. 以 Human Total RNA (200 ng~200 fg) 为模板，使用本试剂盒进行 One Step RT-qPCR 检测 *β Actin* Gene (GC 含量 58.7%) 。



结果如上图所示：1、扩增效率为 90.34%， $R^2=0.9988$ ；

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

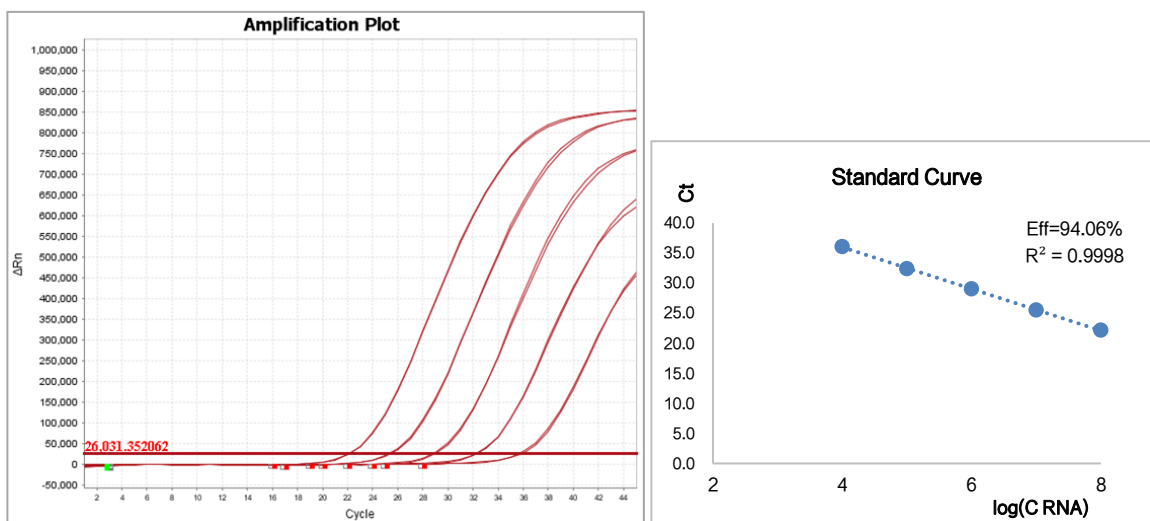
3. 以玉米 Total RNA (100 ng~10 pg) 为模板, 使用本试剂盒进行 One Step RT-qPCR 检测 *NAC1* Gene (GC 含量 69.0%) 。



结果如上图所示: 1、扩增效率为 95.58%, $R^2=0.9990$;

2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量, 100 ng~10 pg Total RNA 进行 RT-qPCR 反应的扩增曲线呈现良好的线性关系。

4. 以猪肉 Total RNA (100 ng~10 pg) 为模板, 使用本试剂盒进行 One Step RT-qPCR 检测 *IGF2* Gene (GC 含量 75.2%) 。



结果如上图所示: 1、扩增效率为 94.06%, $R^2=0.9998$;

2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量, 100 ng~10 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，PCR 反应扩增效率较低，反应结果重复性较差。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，扩增曲线异常；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；将模板适当稀释后加样。
- ❖ 模板不纯：①含有抑制反转录反应、PCR 反应的物质，会导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。②RNA 模板中混有基因组 DNA，可能影响结果准确性。可对模板重新提纯。
- ❖ 模板降解：导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。可重新制备模板，重复试验。

2. 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 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度高：导致反应特异性不好。可适当降低引物浓度。
- ❖ 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°C，两引物 Tm 值相差不超过 5°C。
 - 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。

3. 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°C，一般控制在 65°C~70°C 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。

4. 合适的退火温度

- ❖ 退火温度过低：导致反应特异性不好，出现引物二聚体。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。适当降低退火温度。

5. 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。

6. 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。