

Version 3

Code No. AG11732

*Evo M-MLV*一步法 RT-qPCR 试剂盒(SYBR 法) Ver.2

Evo M-MLV One Step RT-qPCR Kit (SYBR) Ver.2

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

本产品是使用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 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。本产品使用了延伸能力较强的 *Evo M-MLV* 反转录酶，整合热启动 *Pro Taq HS* 的优越性能，适用性广，可用于各种模板的扩增，在短时间内即可高效合成 cDNA 并高效稳定地进行 qPCR 扩增。

➤ 产品组成

组分名称	AG11732 (250 rxns / 20 μl)
2X One Step RT-qPCR Buffer II (SYBR) ^{*1}	1.25 ml x 2 pcs
One Step Enzyme Mix II ^{*2}	200 μl
RNase free water	1 ml x 3 pcs

*1: 该溶液中含有 dNTP Mixture、反应 Buffer 与 SYBR 染料，请避光保存。

*2: 含有 *Evo M-MLV* RTase, RNase Inhibitor, *Pro Taq HS* DNA Polymerase。

➤ 保存及运输

保存温度：-20℃保存。【2X One Step RT-qPCR Buffer II (SYBR)请避光保存。】

运输温度：干冰运输或-20℃冰袋运输。

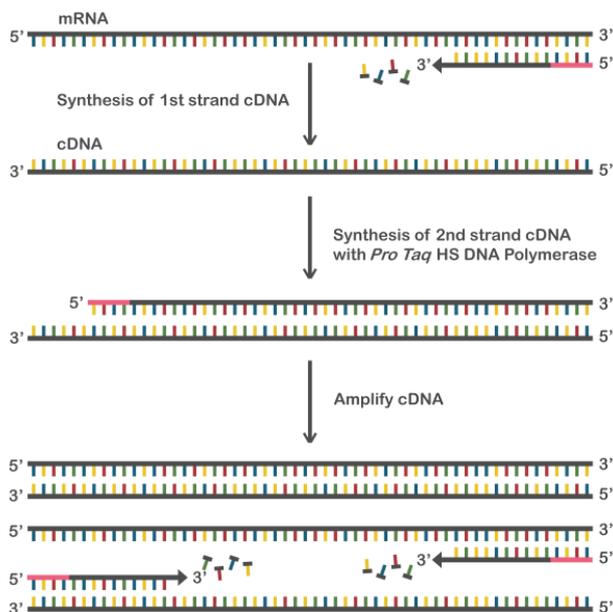
➤ 产品优势

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，可有效地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、性能优越的热启动酶 *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。

➤ 实验原理

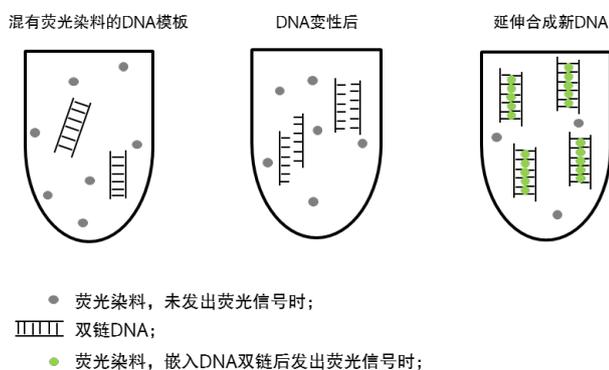
1. 一步法 RT-PCR 扩增原理

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. qPCR 反应原理

SYBR Green I 荧光染料嵌合法利用 SYBR Green I 与双链 DNA 结合后发出荧光的原理，首先将荧光染料 SYBR 加入 PCR 反应液中，在 PCR 扩增的延伸过程中，SYBR Green I 可以嵌合到双链 DNA 双螺旋小沟区域并发出荧光，此时通过检测反应进程中的荧光信号值，达到对靶标基因进行定性/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。
- One Step Enzyme Mix II 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 II (SYBR)含有 SYBR Green I, 因此操作过程中要注意避免强光照射; 融化过程中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 (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。
- 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、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; (TaKaRa) Thermal Cycler Dice™ TP700, TP760, TP900, TP960, TP950, TP970, TP980, TP990;
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, ViiA™ 7, 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 μl 体系 ^{*1}	50 μl 体系 ^{*1}
2X One Step RT-qPCR Buffer II (SYBR)	10 μl	25 μl
One Step Enzyme Mix II	0.8 μl	2 μl
Primer F (10 μM) ^{*2}	0.8 μl	2 μl
Primer R (10 μM) ^{*2}	0.8 μl	2 μl
ROX Reference Dye (4 μM) ^{*3}	0.4 μl	1 μl
Template ^{*4}	≤ 100 ng	≤ 250 ng
RNase free water	up to 20 μl	up to 50 μl

*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 0.4 μM, 也可以在 0.2 ~ 1.0 μM 范围内调整。

*3: 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。

*4: 在 20 μl 体系里, RNA 模板添加量通常不高于 100 ng; 在 50 μl 体系里, RNA 模板添加量通常不高于 250 ng。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)

步骤	温度	时间	循环数
反转录	42°C ^{*2}	5 min ^{*2}	1
预变性	95°C	10 sec ^{*3}	1
变性	95°C	5 sec	} 40
退火和延伸 ^{*5}	60°C	30 sec ^{*4}	
溶解曲线采集 ^{*6}	95°C	15 sec	} 1
	60°C	1 min	
	95°C	1 sec	

*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, 如扩增结果不好, 可尝试调整反转录温度至 50°C, 也可延长反转录时间, 以得到理想的实验结果。

*3: 预变性时间通常设定为 10 sec, 如果模板变性困难, 可以延长预变性时间至 1 ~ 2 min。

*4: PCR 扩增产物建议设计在 80 bp ~ 150 bp, 可延长至 300 bp, 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

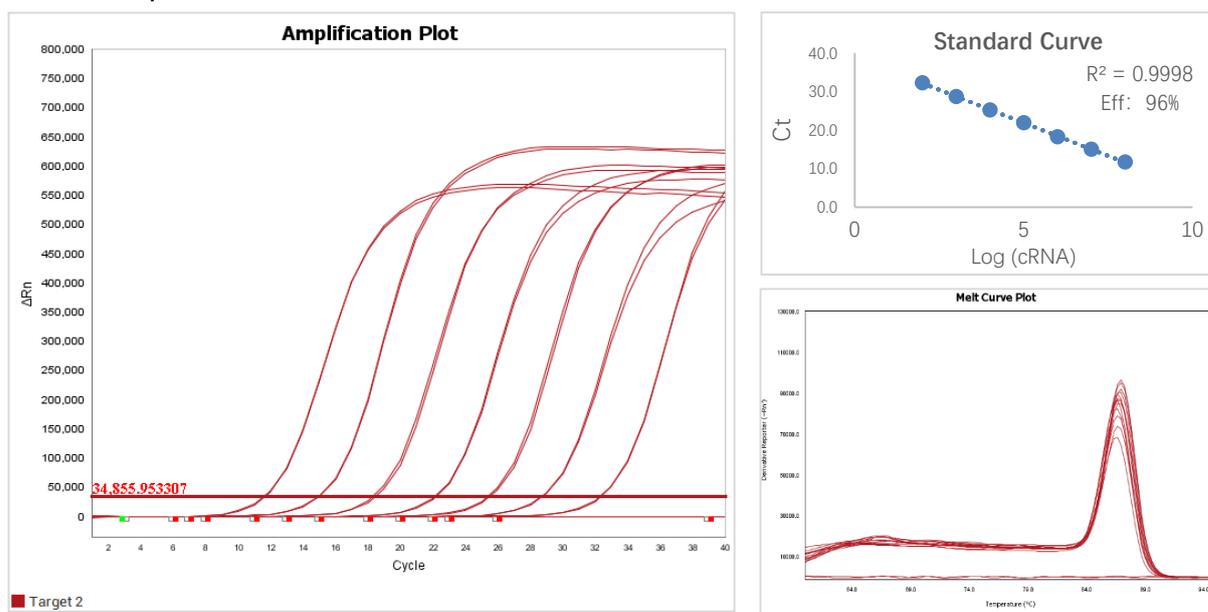
PCR 扩增。（三步法 PCR 反应程序见附录。）

*5: 此步骤进行荧光信号值采集。

*6: 此步为必须步骤，此熔解曲线为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems Standard 模式下默认程序。不同仪器的熔解曲线采集程序不同，选用仪器对应的默认程序即可。

➤ 实验例

1. 以 Mouse Total RNA (100 ng ~ 100 fg) 为模板，使用本产品进行 One Step RT-qPCR 检测 *ApoE* Gene。



结果如上图所示：1、扩增效率为 96%， $R^2=0.9998$ 。

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

3、熔解曲线峰型单一、无杂峰，扩增特异性强。

➤ 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：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；若 RNA 模板中混有基因组 DNA，可能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 RT-qPCR 反应扩增结果 Ct 值较大，扩增效率较低。可重新制备模板，重复实验。

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°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。

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。

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。
- ❖ 2X One Step RT-qPCR Buffer II (SYBR) 含有 SYBR Green I，因此溶液操作过程中要注意避免强光照射，保存时请 -20°C 避光保存。
- ❖ 2X One Step RT-qPCR Buffer II (SYBR) -20°C 存放可能会产生白色沉淀，使用前确保完全融化并混匀。

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。

➤ 附录：三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
反转录	42°C ^{*2}	5 min ^{*2}	1
预变性	95°C	30 sec ^{*3}	1
变性	95°C	5 sec	} 40
退火	55°C	30 sec ^{*4}	
延伸 ^{*1}	72°C	30 sec	
溶解曲线采集 ^{*2}	95°C	15 sec	} 1
	60°C	1 min	
	95°C	1 sec	

*1：此步骤进行荧光信号值采集。

*2：此步为必须步骤，此溶解曲线为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems Standard 模式下默认程序。不同仪器的溶解曲线采集程序不同，选用仪器对应的默认程序即可。