Version 2

Code No. AG11749

Evo M-MLV 一步法 RT-qPCR 试剂盒（适用于经典猪瘟病毒检测，含 UNG，不含引物探针）

Evo M-MLV One Step RT-qPCR Probe Kit for CSFV (UNG Plus, Primer Free)

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

本产品是适用于探针法进行经典猪瘟病毒（CSFV）检测的专用试剂盒。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。

本产品采用了反应性能优越的 *Evo M-MLV* 反转录酶和 *Accurate Taq* HS DNA 聚合酶，配合精心优化的 Buffer，可以在短时间内合成 cDNA 并进行高效稳定的 qPCR 扩增，非常适合经典猪瘟等 RNA 病毒检测。

本产品中引入了 dUTP/UNG 防污染系统，在 PCR 反应过程中以 dUTP 取代 dTTP，利用 UNG 酶能选择性水解含 dU 的 DNA 链，而对不含 dU 的 DNA 链没有任何影响的特性，除去 PCR 反应体系配制过程中引入的含 dU 的污染模板，从而可有效防止 PCR 假阳性结果的产生；同时，本产品中还添加了在常温状态下能够抑制 DNA Polymerase 活性的单克隆抗体，能够有效抑制非特异性扩增，提高反应灵敏度，提升结果准确性。

➢ 产品组成

组分名称	AG11749 （200 rxns / 25 μl）
2X One Step RT-qPCR Buffer for CSFV (Probe)	1.25 ml X 2 pcs
One Step Enzyme Mix Ⅲ*	400 μl
RNase free water	1 ml X 3 pcs

*：含有 *Evo M-MLV* RTase Enzyme、*Accurate Taq* HS DNA Polymerase、UNG Enzyme 与 RNase Inhibitor。

➢ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

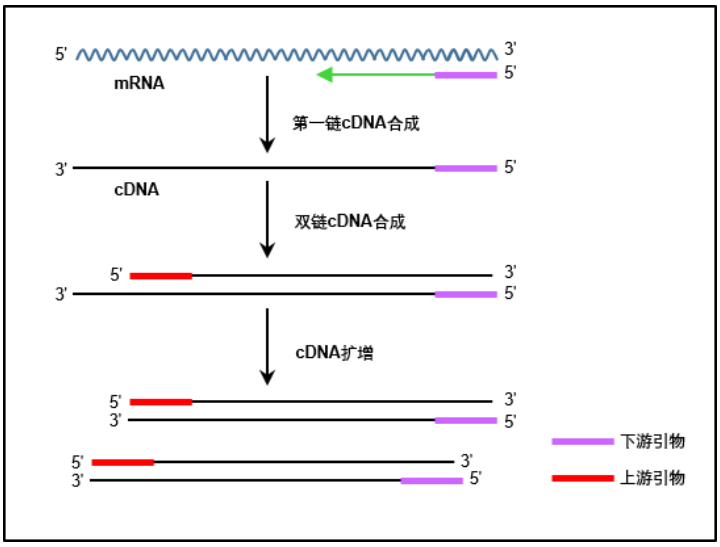
运输温度：干冰运输或-20℃冰袋运输。

➢ 产品优势

1. 本产品是一步法 RT-qPCR 反应试剂盒，可在单管内完成反转录与 qPCR 反应，简化操作，提高效率，可有效地降低因多次操作而造成污染的可能性。
2. 本产品采用了反应性能优越的反转录酶和热启动聚合酶，搭配精心优化的反应体系，具有特异性强、扩增效率高的特性，非常适合经典猪瘟等 RNA 病毒检测。
3. 本产品中引入了 dUTP/UNG 防污染系统，可除去含 dU 的 PCR 产物污染，从而有效防止出现 PCR 假阳性结果，提升实验结果的准确性。

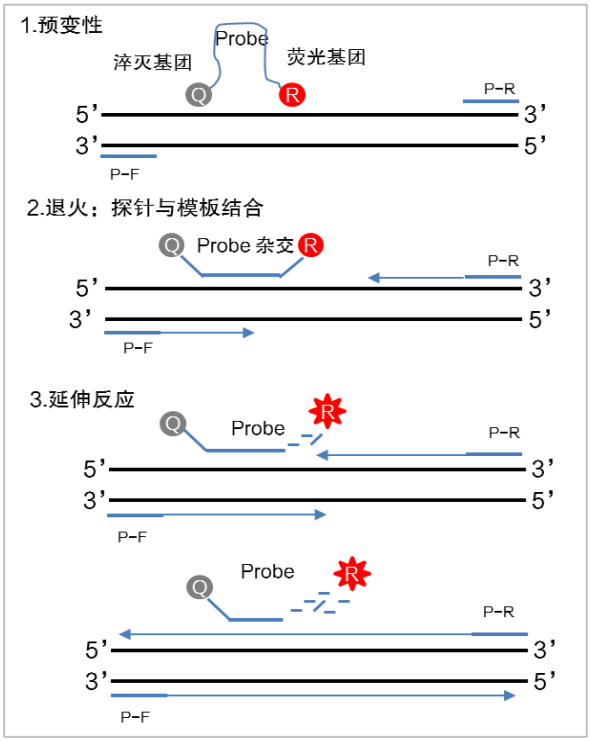
➢ 实验原理

1. 一步法 RT-PCR 扩增原理



一步法 RT-PCR 是常用的 RNA 分析技术之一，可在一个反应管中同时进行反转录及后续的 PCR 扩增。与两步法 RT-PCR 相比，一步法 RT-PCR 具有分析简单快速、试剂配制简便、污染风险较低等优点。RT-PCR 过程中，在反转录酶的作用下，以特异性下游引物为反转引物将 RNA 反转录成第一条 cDNA 链。再以第一条 cDNA 链为模板，特异性上游引物与之互补配对，并在 DNA 聚合酶的作用下延伸，形成双链 DNA。在此基础上，DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。

2. 荧光探针 qPCR 检测原理

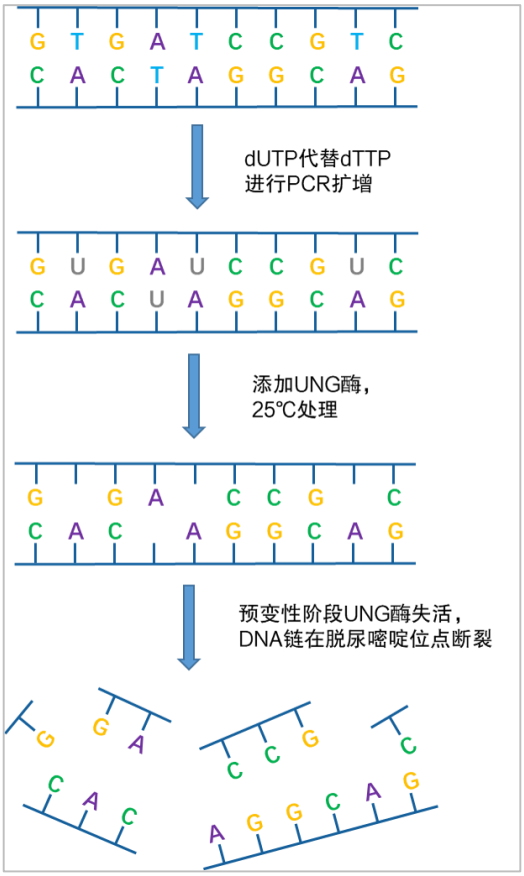


荧光探针检测所用的探针在 5’端标记有荧光物质（如：FAM），3’端标记有淬灭物质（如：BHQ），当探针保持完整时，5’端荧光基团发射的荧光受 3’端淬灭基团淬灭，不能发出荧光信号；但是当探针被分解后，5’端荧光基团与 3’端淬灭基团分离，释放荧光信号。

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。

3. dUTP/UNG 防污染系统作用原理

扩增产物所形成的气溶胶，是 PCR 反应中最主要的污染源之一。扩增产物中片段拷贝数大，即使极微量体积的气溶胶，其片段拷贝数也远远超过 PCR 检测下限，从而造成后续 PCR 反应的假阳性结果。由于气溶胶难以通过常规方法去除，因此 UNG 酶应运而生。



尿嘧啶-N-糖基化酶（Uracil-N-glycosylase，UNG）可以选择性水解双链或单链 DNA 中尿嘧啶脱氧核糖核苷酸（dU）中的尿嘧啶糖苷键。如果在 PCR 反应中用 dUTP 代替 dTTP，使 PCR 扩增产物都是带有 dU 的 DNA 链，并在后续 PCR 反应开始前增加 25℃的恒温步骤，那么 PCR 体系中污染模板的尿嘧啶碱基会因 UNG 酶特异性切割 β-N 尿嘧啶糖苷键而从 DNA 链上脱离，产生脱嘧啶位点。当反应经过预变性阶段 95℃，2 min 热处理后，DNA 污染模板在脱嘧啶位点处断裂，从而无法被扩增，避免了假阳性结果的产生，同时 UNG 酶被灭活，不再降解新产生的含有 dU 的 DNA 产物。

➢ 使用注意事项

1. 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。
2. 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，以避免 RNase 污染。
3. One Step Enzyme Mix Ⅲ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，并用移液器轻柔吸打混匀（避免起泡），然后再进行使用。
4. 所有反应混合液建议在冰上配制。
5. 需要几个样本同时进行检测时，可先将各组分溶液配制成预混液，然后分装到每个反应管中。
6. 2X One Step RT-qPCR Buffer for CSFV (Probe）使用前请充分溶解、混匀，确保溶液中无沉淀。
7. 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，可根据仪器操作要求调整 ROX Reference Dye 添加量。

8. 产品避免反复冻融，防止酶活降低；使用前可上下颠倒混匀或用移液器吸打混匀，请勿涡旋振荡混匀，防止酶活降低，同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。
9. 本产品中不含引物及探针。

➢ 实验前准备

1. **试剂 & 耗材：**

引物、探针、水（RNase-free）、1.5 ml 离心管（RNase-free）、定量 PCR 管（RNase-free）、枪头（RNase-free）、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 0.4μM）	(Thermo) ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900 HT, 7900 HT Fast, StepOne, StepOnePlus;
添加 ROX（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 QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems 为例）

1. 配制 PCR 反应液[*1]

组分名称	反应终浓度	25μl 体系
2X One Step RT-qPCR Buffer for CSFV (Probe)	1X	12.5μl
One Step Enzyme Mix Ⅲ	-	2μl
Primer F（50μM）	0.4μM[*2]	0.2μl
Primer R（50μM）	0.4μM[*2]	0.2μl
Probe（50μM）	0.4μM[*3]	0.2μl
ROX Reference Dye（4μM）[*4]	0.08μM	0.5μl
Template	-	≤ 100 ng[*5]
RNase free water	-	Up to 25μl

*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 0.4μM，也可根据实际需求在 0.2 ~ 1.0μM 范围内调整。

*3：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。探针推荐使用终浓度为 0.4μM，可根据实际需求在 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 进行荧光信号校准，ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。

*5：在 25μl 体系里，RNA 模板添加量通常不高于 100 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
UNG 处理	25℃[*2]	10 min[*2]	1
反转录	50℃[*3]	15 min[*3]	1
预变性	95℃	30 sec[*4]	1
变性	95℃	5 sec	45
退火和延伸	60℃[*5]	30 sec[*5]	

*1：请参照仪器操作手册设置反应条件。

*2：建议在 25℃，10 min 条件下进行 UNG 处理，能够充分降解含 dU 的污染模板；可根据实际需求在 5 ~ 10 min 范围内调整处理时间。

*3：反转录反应在 50℃，15 min 条件下可以得到较好的结果；同时，也可根据实际需求在 5 ~

15 min 范围内调整反转录反应时间，以得到理想的实验结果。

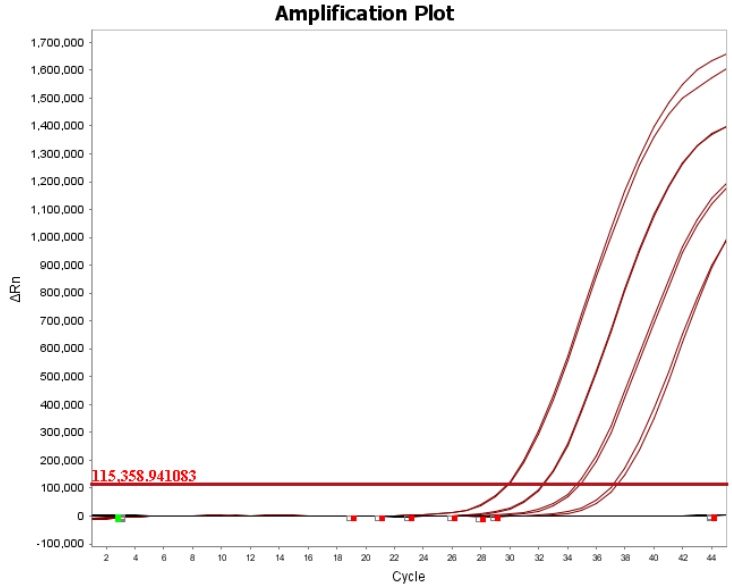
*4：预变性时间通常设定为 30 sec，如果模板变性困难，可根据实际需求在 30 sec ~ 5 min 调整预变性时间。

*5：通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下，扩增退火和延伸反应条件设定为 60℃、30 sec 时可以满足要求；如需提高反应特异性，可适当提高退火和延伸温度；如需提高扩增效率，或者 PCR 扩增产物较长，则可将反应退火和延伸时间适当延长，同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增（三步法 PCR 反应程序可参考附录）。

➢ 实验例

1. 以经典猪瘟病毒 CSFV 标准质粒为模板，使用本产品进行荧光探针 qPCR 方法检测 CSFV 病毒，25μl 反应体系中模板加入量为 125 copies、25 copies、5 copies、1 copies、0 copies（阴性对照）。

所用定量仪器：ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems，实验结果如下：



结果如上图所示：1、不同浓度的模板在 45 cycles 内均能获得良好的扩增。

2、阴性对照在 40 cycles 内没有检出。

➢ 产品注意事项

1. 合适的模板加入量及浓度

❖ 模板量低：可能会导致扩增结果 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。可适当提高模板量。

❖ 模板量高：可能会导致扩增结果 Ct 值较小，荧光信号值较高，扩增曲线异常。可适当降低模板量。

- ❖ 模板浓度高：模板取液量体积较小，可能会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 PCR 反应的物质，可能会导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。可重新纯化模板。
- ❖ 模板降解：可能会导致扩增结果 Ct 值较大，PCR 反应扩增效率较低。可重新制备模板，重复实验。

3. 合适的引物

- ❖ 引物浓度低：可能会导致反应效率低，扩增结果 Ct 值较大。可尝试提高 PCR 扩增引物反应浓度。
- ❖ 引物浓度高：可能会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℃，尽量减小两者的 Tm 值差，并使差值不超过 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，一般不要超过 4 个碱基连续互补序列，尤其是 3’端，否则可能会形成引物二聚体，影响实验结果。

4. 合适的探针

- ❖ 探针浓度过高：可能会导致背景值偏高；若进行多重定量 PCR 检测，易造成探针之间相互干扰。
- ❖ 探针浓度过低：可能会导致扩增结果 Ct 值较大，荧光信号值较低。
- ❖ 探针设计的原则：
  - ① 探针长度一般为 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 碱基数量少于 G 碱基数量，可选择其互补链。
  - ③ 应避免探针中多个重复的碱基出现，尤其是要避免 4 个及以上的 G 碱基出现。
  - ④ 探针的 Tm 值通常比扩增引物 Tm 值高 10℃，一般控制在 65℃ ~ 70℃左右。
  - ⑤ 探针尽量靠近扩增引物，但不可与之重叠。

5. 合适的退火温度

- 退火温度过低：可能会导致反应特异性不好，或形成引物二聚体。可适当提高退火温度。
- 退火温度过高：可能会导致扩增效率低，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 浓度与仪器是否匹配，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

- 实验过程中应穿戴好实验服，佩戴好一次性的口罩、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
UNG 处理	25℃	10 min	1
反转录	50℃	15 min	1
预变性	95℃	30 sec	1
变性	95℃	5 sec	45
退火	55℃	30 sec	
延伸	72℃	30 sec	