Version 1

Code No. AG11763

Evo M-MLV 一步法 RT-qPCR 预混液 (SYBR, UNG Plus)

Evo M-MLV One Step RT-qPCR Mix (SYBR, UNG Plus)

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 SYBR Green I 嵌合荧光法进行一步法 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。本产品使用了新型耐热、延伸能力强的 *Evo Super M-MLV* 反转录酶，整合新型 *Accurate Super Taq* HS 聚合酶的优越性能，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。

本产品中还引入了 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，提高实验结果的准确性。

➢ 产品组成

组分名称	(250 rxns / 20 μ l)
2X One Step RT-qPCR Premix (SYBR, UNG Plus)*1	1.25 ml x 2 pcs
RNase free water	1 ml x 3 pcs

*1：该溶液中含 SYBR 染料，请避光保存。

➢ 保存及运输

保存温度：-20℃避光保存。

运输温度：干冰运输或-20℃冰袋运输。

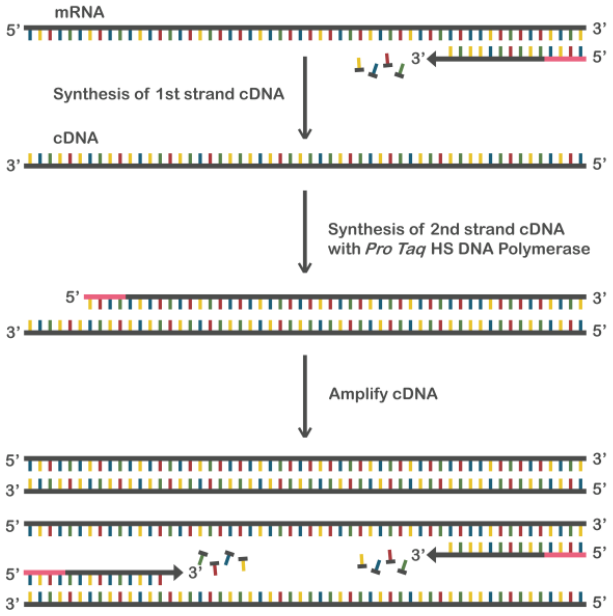
➢ 产品优势

1. 本产品是一种 2X 一步法 RT-qPCR 反应预混液，预先混有 SYBR Green I，可在单管内完成反转录与 qPCR 反应，反应液配制十分简单，仅需加入引物、模板及 RNase free water 即可进行 qPCR 反应。
2. 本产品采用了延伸能力强的 *Evo Super M-MLV* 反转录酶、性能优越的热启动酶 *Accurate Super 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。
4. 本产品可快速、准确的检测微量 RNA。

实验原理

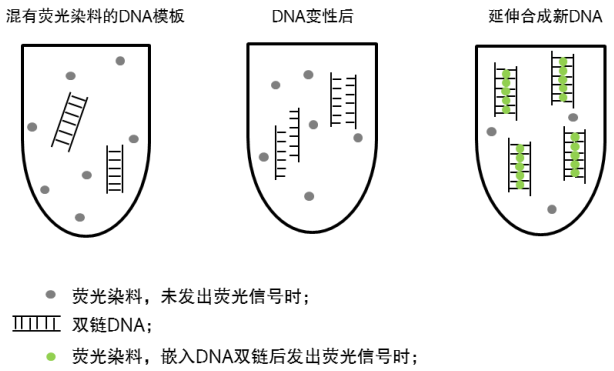
1. 一步法 RT-PCR 扩增原理

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

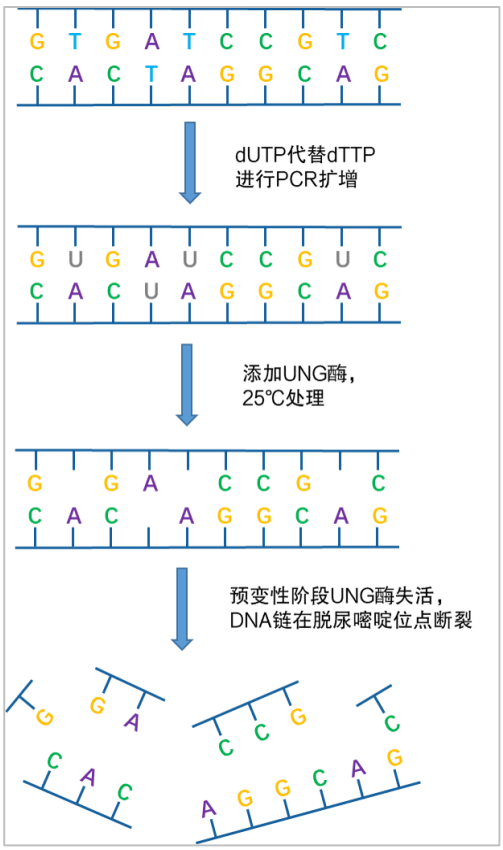
SYBR Green I 荧光染料嵌合法利用 SYBR Green I 与双链 DNA 结合后发出荧光的原理，首先将荧光染料 SYBR 加入 PCR 反应液中，在 PCR 扩增的延伸过程中，SYBR Green I 可以嵌合到双链 DNA 双螺旋小沟区域并发出荧光，此时通过检测反应进程中的荧光信号值，达到对靶标基因进行定性/定量分析的目的。



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

- 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。
- 本产品含有 SYBR Green I，因此操作过程中要注意避免强光照射。
- 本产品在-20℃存放时可能会产生淡黄色的沉淀，属于正常现象，使用前可放冰上溶解，充分颠倒混匀至沉淀全部消失。
- 本产品为防止酶活降低，请勿涡旋振荡混匀，尽量避免反复冻融；使用前可上下颠倒混匀，同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。
- 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。

- 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，不能使用 Random Primer、Oligo dT Primer。**

➢ 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;
添加 ROX （终浓度为 0.4μM)	(Thermo) ABI7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT 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	20μl 体系[*1]	50μl 体系[*1]
2X One Step RT-qPCR Premix (SYBR, UNG Plus)	10 μl	25 μl
Primer F (10μM)[*2]	0.8μl	2μl
Primer R (10μM)[*2]	0.8μl	2μl
ROX Reference Dye (4μM)[*3]	0.4μl	1μl
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 0.4μM，也可以在 0.2～1.0μM 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 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 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
UNG 处理	25℃	0～5 min[*2]	1
反转录	50℃[*3]	5 min[*3]	1
预变性	95℃	30 sec[*4]	1
变性	95℃	5 sec	40
退火和延伸[*6]	60℃	30 sec[*5]	
熔解曲线采集[*7]	95℃	15 sec	1
	60℃	1 min	
	95℃	1 sec	

*1：请参照仪器操作手册设置反应条件。

*2：建议在 25℃，5 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 0～5 min 范围内调整处理时间。

*3：反转录反应在 50℃，5 min 条件下可以得到较好的结果；如模板较复杂可以将反转温度提升至 55℃，反转时间也可根据实际情况在 3～10 min 范围内调整，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，可以延长预变性时间至 1～2 min。

*5：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℃、

30 sec 时通常情况下可以满足要求；如需快速检测，可根据需求缩短延伸时间，延伸时间可在 10 ~ 30 sec 进行调整测试；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 反应程序见附录一）

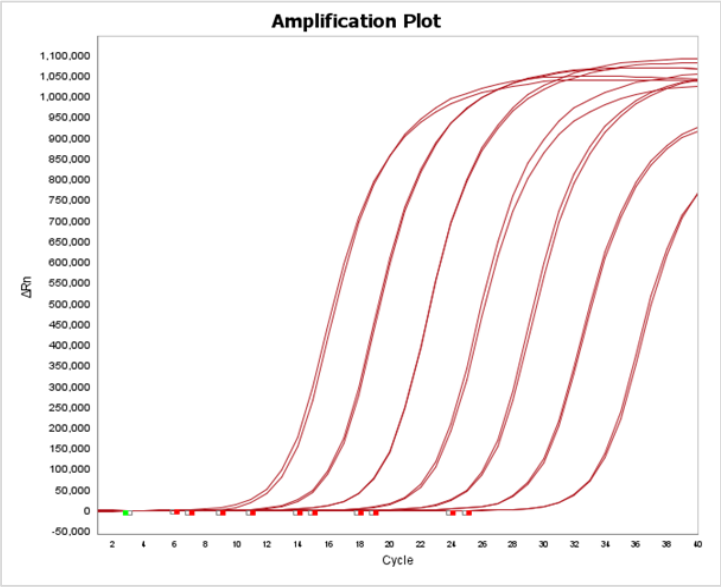
*6：此步骤进行荧光信号值采集。

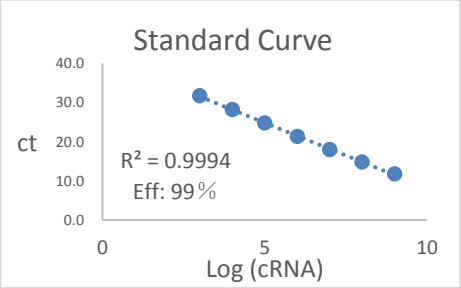
*7：**此步为必须步骤，此熔解曲线为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems Standard 模式下默认程序。但仪器类型不同，熔解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。**

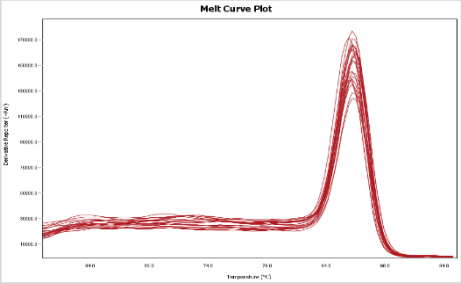
3） 反应结束后确认扩增曲线是否正常，熔解曲线是否单一，并进行标准曲线分析。

➢ 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 99%，R^2=0.9994；

2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量，100 ng ~ 100 fg Total RN 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℃，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。

- 本产品含有 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℃避光保存。
- 本产品-20℃存放可能会产生黄色沉淀，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。

附录一：三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
UNG 处理	25℃	5 min	1
反转录	50℃	5 min	1
预变性	95℃	30 sec	1
变性	95℃	5 sec	40
退火	55℃	30 sec	
延伸*1	72℃	30 sec	
熔解曲线采集*2	95℃	15 sec	1
	60℃	1 min	
	95℃	1 sec	

*1：此步骤进行荧光信号值采集。

***2：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。但仪器类型不同，熔解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。**