Version 1

Code No. CM0273

4X 一步法 RT-qPCR 预混型探针法试剂盒

(含 UNG，可兼容引物探针预混)

4X One Step RT-qPCR Mixture Probe qPCR Kit

(UNG Plus，Primer-Probe PreMix Compatible)

ACCURATE BIOLOGY

艾科瑞生物

产品概述

本产品是基于探针法进行一步法 RT-qPCR 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。

本产品使用了新型改造的 *Evo Super M-MLV* 反转录酶，配合优化的 *Accurate Taq* HS 聚合酶，可以在短时间内高效合成 cDNA 并进行高效稳定的 qPCR 扩增，并支持引物探针提前预混。本产品适用性广，杂质耐受强，对于不同复杂度的基因均可以进行很好的扩增，同时该产品可兼顾单重或多重检测。适用于 DNA/RNA 等微量病毒的检测。

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；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	CM0273 (250 rxns / 20 μ l)
4X One Step Probe Mixture II (UNG Plus) *	1.25 ml

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

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

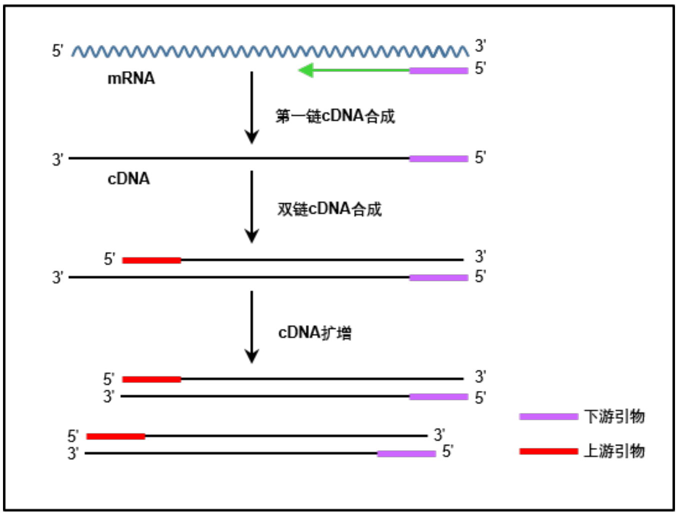
产品优势

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. 本产品采用了新型改造的 *Evo Super M-MLV* 反转录酶，配合优化的 *Accurate Taq* HS 聚合酶，搭配精心优化的反应体系，具有特异性强、扩增效率高等特点。
3. 本产品支持引物探针提前预混。
4. 本产品灵敏度高，可对个位数拷贝模板稳定检出，并可进行单重或者多重检测。
5. 本产品可以进行 DNA/RNA 共检。
6. 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

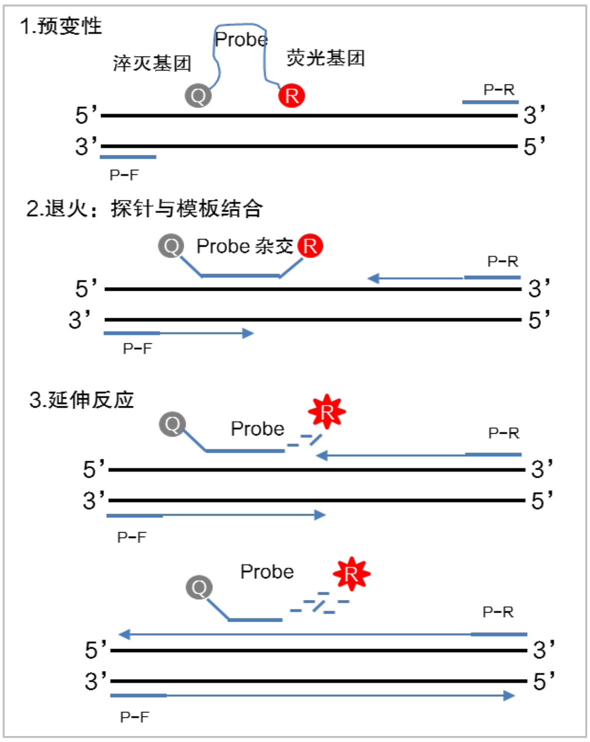
一步法 RT-PCR 是常用的 RNA 分析技术之一，可在一个反应管中同时进行反转录及后续的 PCR 扩增。与两步法 RT-PCR 相比，一步法 RT-PCR 具有分析简单快速、试剂配制简便、污染风险较低等优点。RT-PCR 过程中，在反转录酶的作用下，以特异性下游引物为反转引物将 RNA 反转录成第一条 cDNA 链。再以第一条 cDNA 链为模板，特异性上游引物与之互补配对，并在 DNA 聚合酶的作用下延伸，形成双链 DNA。在此基础上，DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。



2. 荧光探针 qPCR 检测原理

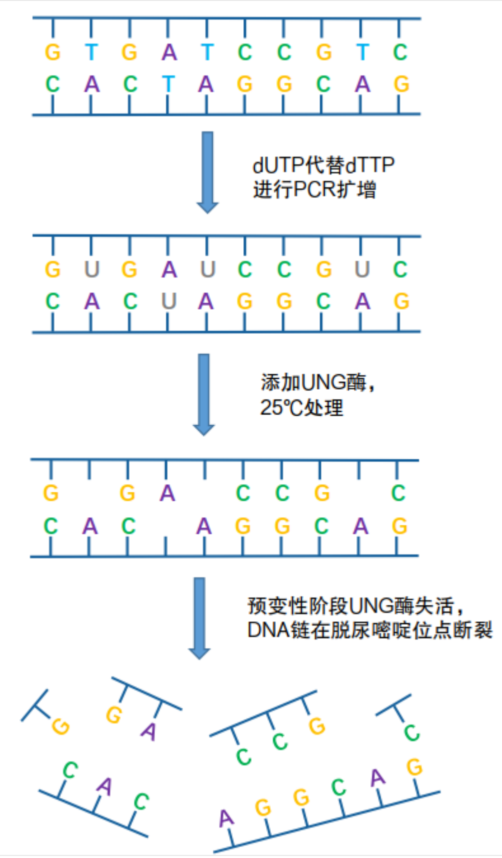
荧光探针检测所用的探针在 5’端标记有荧光物质（如：FAM），3’端标记有淬灭物质（如：BHQ），当探针保持完整时，5’端荧光基团发射的荧光受 3’端淬灭基团淬灭，不能发出荧光信号；但是当探针被分解后，5’端荧光基团与 3’端淬灭基团分离，释放荧光信号。

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. 所有反应混合液建议在冰上配制。
4. 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。
5. 4X One Step Probe Mixture II (UNG Plus）使用前请充分溶解、混匀，确保溶液中无沉淀。
6. 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 μl 反应体系中添加 1 μl 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。

7. 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。

➢ 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 0.4 μM）	(Thermo) ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900 HT, 7900 HT Fast, StepOne, StepOnePlus.
添加 ROX （终浓度为 0.08 μM）	(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 RT-qPCR 反应液[*1]

组分名称	反应终浓度	20μl 体系
4X One Step Probe Mixture II (UNG Plus)	1X	5 μl
Primer F（10μM）	0.2μM[*2]	0.4 μl
Primer R（10μM）	0.2μM[*2]	0.4 μl
Probe（10μM）	0.4μM[*3]	0.8 μl
ROX Reference Dye（4μM）[*4]	0.08μM	0.4 μl
Template	-	≤ 100 ng[*5,*6]
RNase free water	-	Up to 20μl

*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，也可根据实际需求在 0.1 ~ 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 20μl 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。

*6：该制品灵敏度极高，20μl 反应体系中，建议将模板稀释后加入 2 ~ 5μl/样本，以提升实验的准确度及重复性。

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 ~ 15 min[*3]	1
预变性	95℃	30 sec[*4]	1
变性	95℃	5 sec	45
退火和延伸[*6]	60℃	10 ~ 30 sec[*5]	

*1：建议首先采用两步法 PCR 反应程序，如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件。

*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；可根据实际情况在 0 ~ 5 min 内调整。

*3：反转温度通常设置为 50℃，如模板较复杂可以将反转温度提升至 55℃；反转时间建议设置为 15 min，如需快速获得结果可将反转录时间在 **5 ~ 15 min** 内进行调整。

*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 30 sec ~ 2 min。

*5：通常情况下扩增退火和延伸反应条件设定为 60℃、30 sec 时能够获得较好结果，如需快速获得结果可将延伸时间缩短至 **10 sec**，但需要先进行预实验验证是否支持快速程序；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（如＞300 bp)，则可将退火温度和延伸时间适当延长，同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。

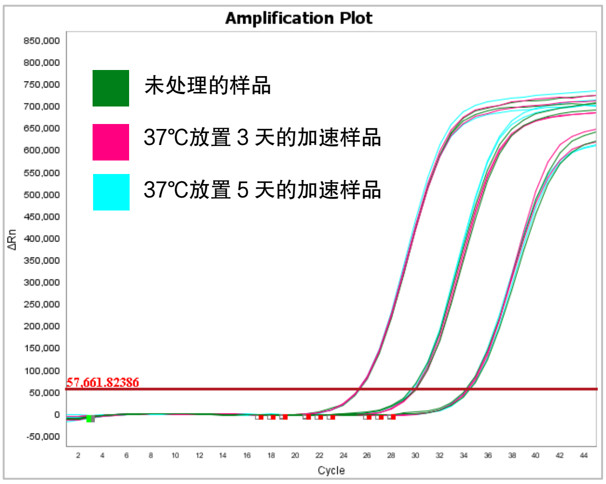
*6：此步骤进行荧光信号采集。

➢ 实验例

一、 提前预混引物探针稳定性实验

1. 以 293T 细胞 Total RNA 为模板，进行 37℃加速稳定性实验，预混引物探针后将 37℃放置 3 天、5 天的加速样品和未处理样品同时进行检测。反应体系中模板加入量为 10ng，1ng 与 100pg。所用定量仪器为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。实验结果如下：

<FAM 通道>



结果如上图所示：

1、37℃放置 3 天、5 天的加速样品（玫红色与蓝色曲线）的性能和未处理样品（绿色曲线）的性能相当。

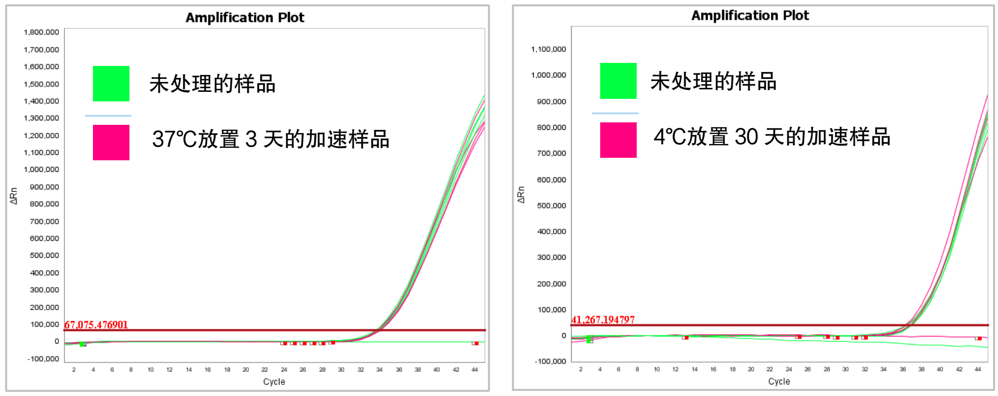
2、本产品可以进行单重检测。

2. 以猪蓝耳病毒 PRRSV JXA1 标准物质［GBW(E)090929］、猪血 RNA 为模板进行，用 RNase free water 代替模板作为阴性对照，预混引物探针后将 37℃放置 3 天加速样品和未处理样品同时进行二重检测，4℃放置 30 天的加速样品和未处理样品同时进

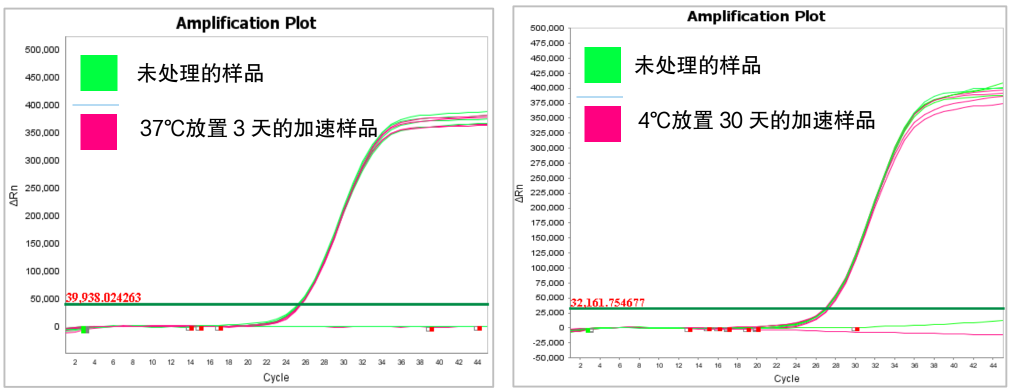
行二重检测，分别检测 ORF 基因（GC 含量为 56%，FAM 通道）、CYTB 基因（GC 含量为 40%，HEX 通道）。反应体系中 PRRSV JXA1 模板加入量为 10 copies，猪血 RNA 模板加入量为 100 pg。

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

<FAM 通道>



<HEX 通道>



结果如上图所示：

1、37℃放置 3 天加速样品、4℃放置 30 天加速样品（玫红色曲线）的性能和未处理样品（浅绿色曲线）的性能相当。

2、阴性对照在 45 cycles 内没有检出。

3、本产品可以进行二重检测。

二、 支持快速程序

1. 以人鼻 C 型 RNA 病毒、人腺 7 型 DNA 病毒标准物质与 293T 细胞 Total RNA 为模板进行三重检测，反应体系中人鼻 C 型 RNA 病毒模板加入量为 10 copies，人腺 7 型 DNA 病毒模板加入量为 25 copies，293T 细胞 Total RNA 模板加入量为 100 pg，三种模板均检测 14 个复孔，用 RNase free water 代替模板作为阴性对照。同时配制后

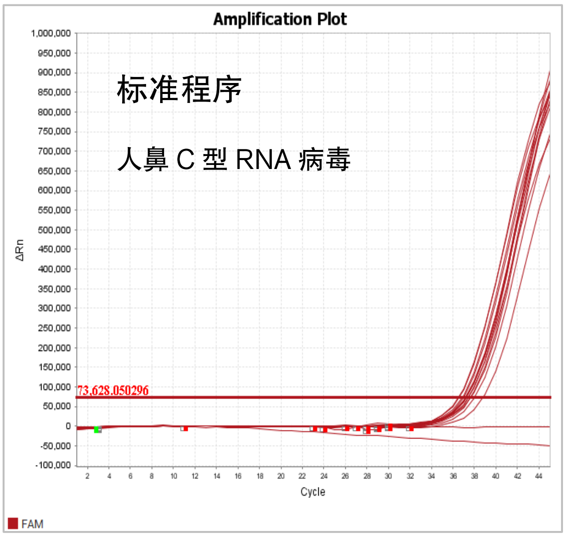
分别进行标准程序及快速程序，所用定量仪器为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。

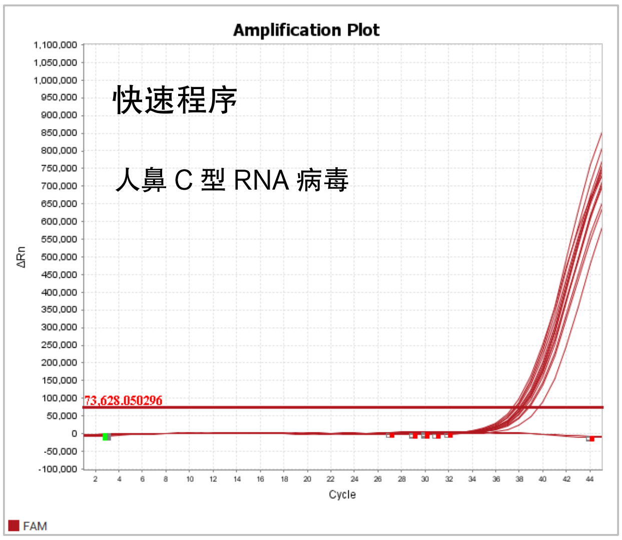
程序如下：

步骤	标准程序			快速程序		
	温度	时间	升降温速率	温度	时间	升降温速率
反转录	50℃	15 min	2.74℃/s	50℃	5 min	3.19℃/s
预变性	95℃	30 sec	2.74℃/s	95℃	30 sec	3.19℃/s
变性	95℃	5 sec	2.74℃/s	95℃	5 sec	3.19℃/s
退火和延伸	60℃	30 sec	2.74℃/s	60℃	10 sec	2.45℃/s
总时长	**约 67min**			**约 40min**		

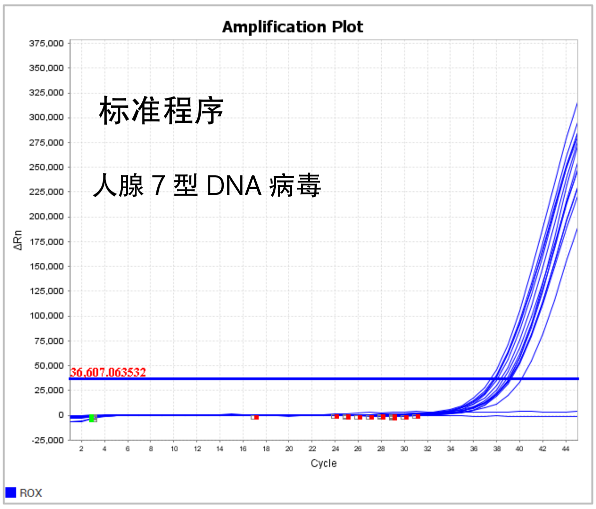
实验结果如下：

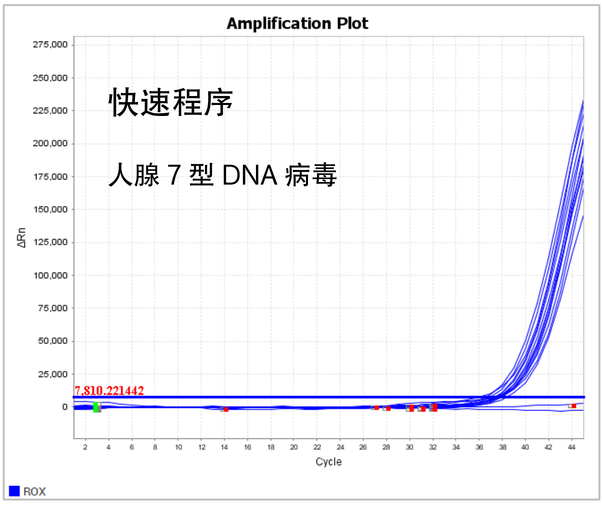
<FAM 通道>



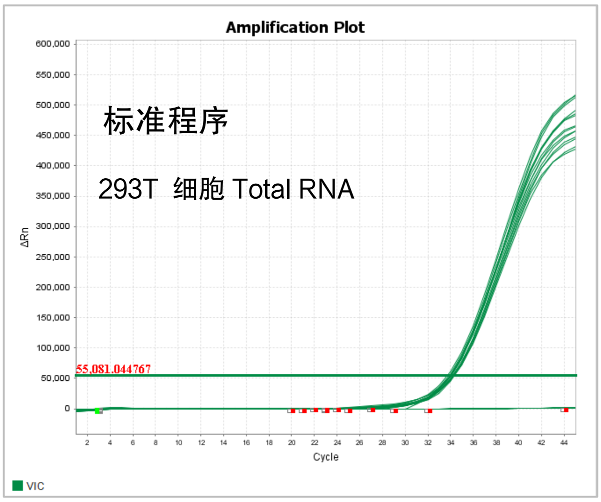


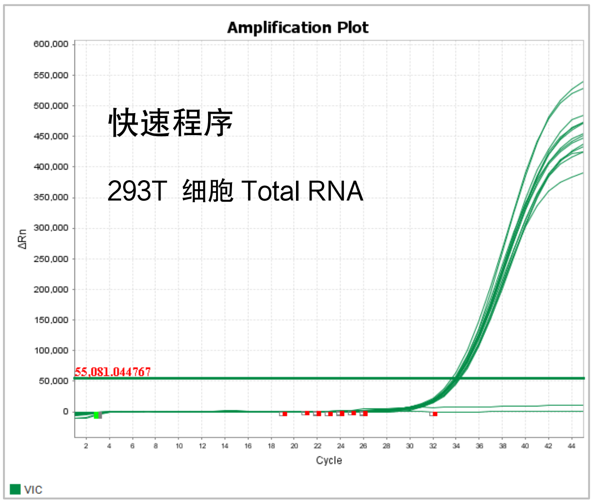
<ROX 通道>





<Cy5 通道>





结果如上图所示：

1、本产品灵敏度极高，对于低拷贝及微量的模板均能进行很好的检出。

2、产品支持快速检测，标准模式与快速模式均能很好的检测，且 14 个复孔均检测出。

3、本产品可以进行多重检测，且可以进行 DNA/RNA 共检。

4、阴性对照在 45 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。可提高模板的稀释倍数或重新纯化模板。

❖ 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℃	5 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[*1]	72℃	30 sec	

*1：此步骤进行荧光信号采集。