

基因/lncRNA/circRNA qPCR 引物使用说明

一、试剂组成

试剂	浓度	储存条件	运输条件
基因/lncRNA/circRNA qPCR Forward Primer	100 μmol/L	-20℃	常温运输
基因/lncRNA/circRNA qPCR Reverse Primer	100 μmol/L		
备注			
1. 产品以100μmol/L的水溶液的形式提供， 常温运输 ，于-20℃或更低温度储存，不反复冻融的情况下可稳定保存 一年 。			
2. 使用前请瞬时离心引物，避免引物储存液粘附于管壁或管盖上。			
3. 引物离心之后建议分装保存，减少多次反复冻融。			
4. 稀释引物建议使用灭菌的ddH ₂ O或者无RNAase水或DEPC水。			
5. 取部分100 μmol/L的引物原液，例如取10ul的100 μmol/L的引物原液加入100ul的ddH ₂ O或者无RNAase水或DEPC水，吹打混匀，即可配置为10μmol/L的引物储存液用于后续qPCR使用。余下的100 μmol/L的引物原液-20℃保存即可。高浓度的引物更有利于引物的保存。			

实验方法

以下是搭配芊陌生物的配套试剂盒 基因/lnc/circRNA qRT-PCR Detection Kit 进行检测试验的操作方法，若使用其它公司的 qRT-PCR 试剂盒，请参考对应试剂盒的操作说明书。

组分编号	组分名称	规格	RXN
QMS1070-1	5X QMScript III RT Mix	400 μ L	100T
QMS1070-2	20X gDNA Remover Mix	100 μ L	100T
QMS1070-3	2X Universal SYBR Green Fastq PCR Mix	5x1mL	500T
QMS1070-4	Nuclease-free H ₂ O	2X1.25mL	/

基因/lnc/circRNA qRT-PCR Detection Kit 组分明细

实验准备

1. 自备器材：1.5mL RNase-free EP 管、200 μ L RNase-free PCR 管、RNase-free 移液器吸头、移液器、PCR 仪、冰盒或冰。
2. RNA：完整高质量的 RNA 对于获得高质量的 cDNA 至关重要。实验前请检测 RNA 是否降解或污染。

注意事项：

1. 细胞上清/血浆/血清/尿液等及外泌体的基因/lncRNA/circRNA qPCR 检测需要在提取 RNA 前加入外参。细胞/组织等类型样本如需做绝对定量检测，一般无需添加外参。
2. 使用 5X QMScript III RT Mix 时，请充分融解，混匀后使用，避免强光直射。若同时需要配制多个 5X QMScript III RT Mix 反应时，应提前配制好所需的工作液，然后再分装到每个反应管，减少试剂损失。
3. 分取之前请瞬时离心收集到管底后使用，使用后立即放回-20 $^{\circ}$ C冰箱保存。
4. 反应液的配制和分装一定使用无污染的枪头、Microtube，尽量避免污染。
5. 预混液中已经包含 Oligo(dT)₂₀VN 和随机引物，不仅适用包含 Poly(A)结构的真核生物 mRNA，也适用于不含 Poly(A)结构的原核生物 RNA、真核生物 rRNA 和 tRNA 等模板，但不适用于 miRNA 等小 RNA 模板逆转录 RT 反应。

6: 对于含有高 GC 或复杂二级结构的 RNA, 可以 65°C 5min (然后迅速置于冰上) 预处理后, 再进行逆转录反应。

*注: 5X QMScript III RT Mix 包含 QMScript III Reverse Transcriptase、Rnase Inhibitor、dNTPs、Random Primers/Oligo(dT)₂₀ VN Primer Mix 等。

20ul RT 反应体系进行实验 (冰上操作):

试剂	终浓度	加量/孔
RNA Template		100pg-1ug*
5X QMScript III RT Mix	1X	4ul
20X gDNA Remover Mix		1ul
无 RNAase 水/DEPC 水		补足至 20ul

RT 反应体系混匀后, 瞬时离心, RT 反应程序在 PCR 仪上按以下反应程序进行逆转录反应: 37°C~2 min, 55°C~15 min, 85°C~5 min, 4°C~hold。

备注:

- 1: 如涉及到需要进行特异性逆转录时, 需要用特异性逆转录引物单独进行逆转录, 则此试剂盒不适用。
- 2: 根据实验要求加入合适的 RNA 量。RNA 模板体积较大时, 请确保 RNA 是溶于水中而不是 TE Buffer 中, 因为 TE 会抑制逆转录反应。
- 3: 逆转录产物(RT 反应液)可立即进行后续 qPCR 反应, 或置于-20 °C 保存并在 3 个月内使用; 长期存放建议分装后在-80°C 保存。cDNA 应避免反复冻融。

mRNA/lncRNA/circRNA qPCR 反应 (冰上操作)

染料法 qRT-PCR 20 μL 反应加样量体系 (推荐以 20ul qPCR 反应体系进行实验)

试剂	终浓度	加量/孔
2X Universal SYBR Green Fastq PCR Mix	1×	10 μL
基因/lncRNA/circRNA qPCR Forward Primer (10 μmol/L)	0.2 μmol/L	0.4 μL
基因/lncRNA/circRNA qPCR Reverse Primer (10 μmol/L)	0.2 μmol/L	0.4 μL
RT product		Variable
无 RNAase 水/DEPC 水		补至 20 μL

注意事项:

- 1: 配制好反应体系轻轻混匀上述反应体系 (避免剧烈涡旋振荡)
- 2: Forward Primer, Reverse Primer 初始反应浓度推荐使用 200nM, 最佳浓度可以在 100nM~800nM 之间优化; 。扩增效率不高的情况下, 可提高引物的浓度; 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度, 并优化反应体系。
- 3: DNA最高使用量不宜超过 qPCR 反应体系的 1/10, 对于表达丰度较高的 mRNA/lncRNA/circRNA, 可将 cDNA 稀释后再进行qPCR, 一般稀释比例可以在 10~1000 倍之间, 请根据具体的Ct 值进行调整。
- 4: 该miRNA qPCR反应程序适用于市面上所有型号的荧光定量PCR仪器 (包括HighROX、LowROX以及NoROX需求的仪器), 无需额外添加ROX。
- 5: 2 X universal SYBR Green Fast qPCR Mix在使用前请充分融解, 避免强光直射, 并注意避光保存。
- 6: 2 X universal SYBR Green Fast qPCR Mix中含有甘油, 在使用前请轻轻混匀, 避免产生气泡; 取用之前应混匀并离心。使用后立即放回-20°C冰箱保存。
- 8: 2 X universal SYBR Green Fast qPCR Mix含有DNA聚合酶, 使用时请置于冰上, 短时间内多次使用可在4°C暂存, 应尽量避免反复冻融。

实时定量 PCR 反应程序

客户可依据具体需求以及结合日常 qPCR 常用程序选择二步法或者三步法来进行 qPCR 反应。

二步法qPCR程序设置如下：

循环	步骤	温度	时间	内容
1 X	预变性	95°C	3 min	Taq 酶激活
40 X	变性	95°C	5 sec	PCR 模板变性
	退火	60°C	40 sec	退火+延伸
溶解曲线分析：采集荧光信号，建议按照仪器qPCR反应程序仪器默认的采集信号设置				
*注：确保延伸后立刻进行荧光信号采集。延伸时间根据qPCR仪所需数据采集时间自行调整：使用StepOnePlus请设定为30s；使用7300请设定为31s；使用7500请设定为34s。				

三步法qPCR程序设置如下：

循环	步骤	温度	时间	内容
1 X	预变性	95°C	3 min	Taq 酶激活
40 X	变性	95°C	5 sec	PCR 模板变性
	退火	60°C	20 sec	退火
	延伸	70°C	10 sec	延伸（收集信号）
采集荧光信号，建议按照仪器qPCR反应程序仪器默认的采集信号设置				

备注：

- 1：无特殊说明，我司 qPCR 引物退火温度均按 $60 \pm 3^\circ\text{C}$ 进行设计。qPCR 程序设置时选择通用退火温度 60°C ，最佳退火温度可在 $57^\circ\text{C} \sim 63^\circ\text{C}$ 之间适当调整；
- 2：部分仪器如 ABI 系列仪器收集荧光信号需要较长的恒温时间方能收集信号，使用此类仪器建议使用两步法，将退火及延伸反应合并，退火延伸温度设置为 60°C ，时间设置为仪器收集信号所需的最短时间。
- 3：SYBR Green I 染料法进行的 qPCR 检测反应都需要在循环结束后立即进行熔解曲线分析，检测温度为 $70^\circ\text{C} \sim 95^\circ\text{C}$ ，升温速率为 $0.5^\circ\text{C}/\text{次}$ ，恒温时间为 5 sec/次。

温馨提示：如涉及到使用本公司产品发表文章请引用产品来源，QianMoBio Co. Ltd, shanghai, China，上海芊陌生物科技有限公司。对于引用注释本公司产品发表的 SCI paper，联系销售或者本公司，可获取对应的科研奖励金。