

基因/lnc/circRNA qRT-PCR Detection Kit使用说明

产品介绍

芊陌生物~基因/lnc/circRNA qRT-PCR Detection Kit 包含 RT 逆转录组分，去 gDNA 组分和 qPCR 组分，一个 kit 完成基因/lnc/circRNA 的逆转录和荧光定量检测。

产品中的 5X QMScript III RT Mix 中含逆转录反应所需的所有相关试剂，只需加入 RNA 模板和无酶水即可进行逆转录反应，操作简单。预混液中的 QMScript III Reverse Transcriptase 是基于 M-MuLV 开发的第三代逆转录酶，降低了 RNase H 活性，提高了热稳定性，反应温度高达 55°C，大幅提升了逆转录效率和对复杂模板（大量二级结构或高 GC 比例）的耐受性，具有更高的特异性、更高的产量。

产品中的 gDNA Remover Mix，可彻底去除 RNA 模板中残留的基因组 DNA，使定量结果更加准确。具有热敏感性，可在高温条件下快速不可逆地失活，因此仅需一次加样，即可同管进行去除基因 DNA 污染与逆转录反应。逆转录产物兼容 SYBR Green 和探针法 qPCR，可以根据实验目的，选择相应的试剂配合使用，进行高性能的基因表达分析。

产品中的 2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 是采用 SYBR® Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 反应的专用试剂，包含除了引物和模板外的所有 qPCR 所需成分。。本产品为通用型试剂，使用芊陌生物设计的特殊参比染料，具有更灵敏的分辨率，并且适用于市面上所有型号的荧光定量 PCR 仪器（包括 High ROX, Low ROX 以及 No ROX 需求的仪器）。本产品通过对 SYBR® / FAM 通道进行荧光信号定量检测，获得 PCR 过程中 DNA 扩增的真实数据。且本产品采用热启动 Taq DNA 聚合酶进行扩增，在保证扩增效果的同时极大地提高了产品的特异性。

组分编号	组分名称	规格	RXN
QMS1070-1	5X QMScript III RT Mix	400μL	100T
QMS1070-2	20X gDNA Remover Mix	100μL	100T
QMS1070-3	2X Universal SYBR Green Fastq PCR Mix	5x1mL	500T
QMS1070-4	Nuclease-free H2O	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、200μL 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/尿液等及分泌体的基因/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°C冰箱保存。
4. 反应液的配制和分装一定使用无污染的气枪头、Microtube，尽量避免污染。
5. 预混液中已经包含 Oligo(dT)₂₀ VN 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°C5min（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。使用后应立即放回 -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				

上海芊陌生物科技有限公司 南京芊陌生物科技有限公司

网址：www.qianmobio.com

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。