

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

产品介绍

基安生物~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 GAScript 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 GAScript 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, 使用基安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
GAS1070-1	5X GAScript III RT Mix	400μL	100T
GAS1070-2	20X gDNA Remover Mix	100μL	100T
GAS1070-3	2X Universal SYBR Green Fastq PCR Mix	5x1mL	500T
GAS1070-4	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 GAScript 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 GAScript 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°C5min (然后迅速置于冰上) 预处理后, 再进行逆转录反应。

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

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溶解曲线分析, 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 $5 \text{ sec}/\text{次}$ 。

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, GeneAdv Co. Ltd, Suzhou, China, 基安生物技术(苏州)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。