

Version 2

Code No. AG11754

*Evo M-MLV*一步法 RT-qPCR 探针法试剂盒 (含 UNG)

Evo M-MLV One Step RT-qPCR Probe Kit (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.

➤ 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。

本产品使用了延伸能力较强的 *Evo M-MLV* 反转录酶, 整合热启动 *Accurate Taq HS* 的优越性能, 可以在短时间内高效合成 cDNA 并进行高效稳定的 qPCR 扩增。本产品适用性广, 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。适用于病毒 RNA 等微量 RNA 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	AG11754 (200 rxns / 25 μ l)
2X One Step RT-qPCR Buffer IV (Probe)	1.25 ml X 2 pcs
One Step Enzyme Mix IV*	400 μ l
RNase free water	1 ml X 3 pcs

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

➤ 保存及运输

保存温度: -20°C 保存

运输温度: 干冰运输或 -20°C 冰袋运输

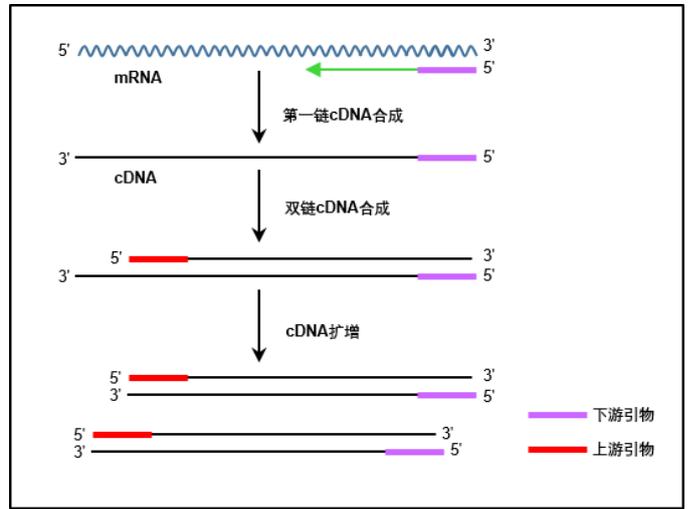
➤ 产品优势

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. 本产品采用了反应性能优越的反转录酶和热启动聚合酶, 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。

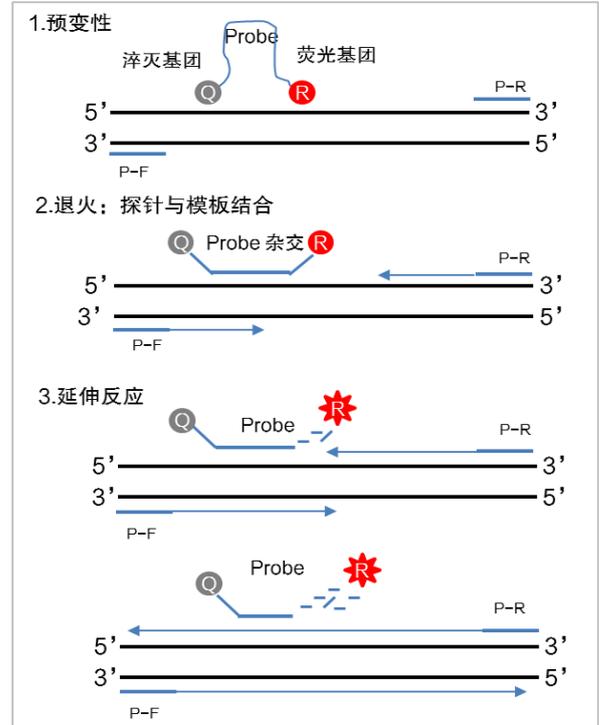


在此基础上, DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环,使得 DNA 片段在数量上呈指数增加,在短时间内获得大量目的基因片段。

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。

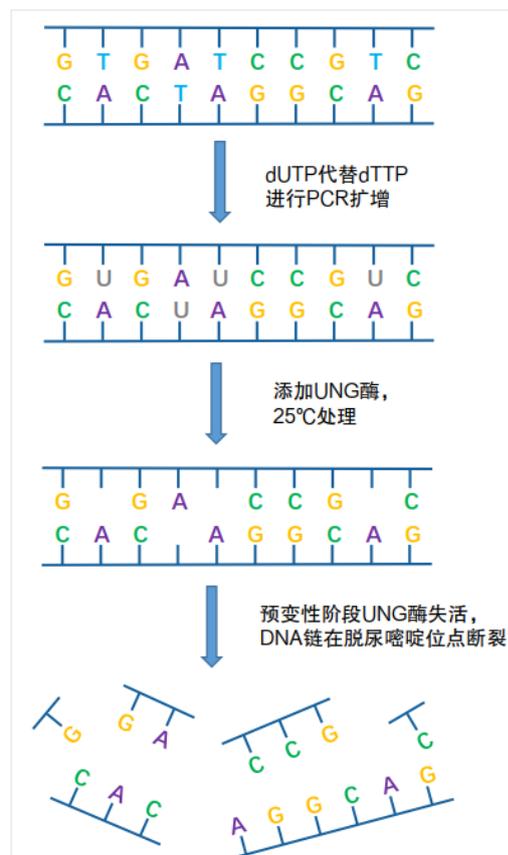
在 PCR 反应过程中, 退火时荧光探针会与待检测模板杂交; 延伸时, *Taq* DNA 聚合酶的 5' → 3' 外切酶活性可以分解杂交的探针, 使得 5' 端荧光基团游离出来, 进而释放荧光信号。通过检测反应体系中的荧光信号强度, 达到对目的基因进行定量分析的目的。



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°C 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. One Step Enzyme Mix IV 甘油浓度较高，使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液器轻柔吸打混匀（避免起泡），然后再进行使用。
4. 所有反应混合液建议在冰上配制。
5. 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。
6. 2X One Step RT-qPCR Buffer IV (Probe) 使用前请充分溶解、混匀，确保溶液中无沉淀。
7. 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 μ l 反应体系中添加 1 μ l 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。

- 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 μ M)	(Thermo) ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900 HT, 7900 HT Fast, StepOne, StepOnePlus;
添加 ROX (终浓度为 0.08 μ M)	(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	25 μl 体系
2X One Step RT-qPCR Buffer IV (Probe)	1X	12.5 μl
One Step Enzyme Mix IV	-	2 μl
Primer F (10 μM)	0.2 μM ^{*2}	0.5 μl
Primer R (10 μM)	0.2 μM ^{*2}	0.5 μl
Probe (10 μM)	0.4 μM ^{*3}	1 μl
ROX Reference Dye (4 μM) ^{*4}	0.08 μM	0.5 μl
Template	-	≤ 100 ng ^{*5,*6}
RNase free water	-	Up to 25 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 0.2 μM, 也可根据实际需求在 0.1 ~ 1.0 μM 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 0.4 μM, 可根据实际需求在 0.1 ~ 1.0 μM 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 25 μl 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, 25 μl 反应体系中, 建议将模板稀释后加入 2-5 μl/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°C ^{*2}	10 min ^{*2}	1
反转录	50°C ^{*3}	15 min ^{*3}	1
预变性	95°C	30 sec ^{*4}	1
变性	95°C	5 sec	} 45
退火和延伸 ^{*6}	60°C ^{*5}	30 sec ^{*5}	

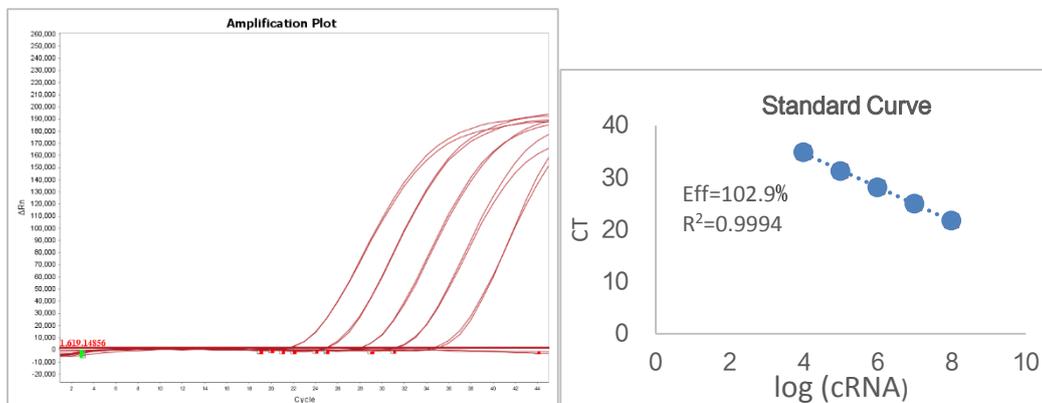
*1: 请参照仪器操作手册设置反应条件。

- *2: 建议在 25°C, 10 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 5 ~ 10 min 范围内调整处理时间。
- *3: 反转录反应在 50°C, 15 min 条件下可以得到较好的结果; 同时, 也可根据实际需求在 5 ~ 15 min 范围内调整反转录反应时间, 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, 可根据实际需求在 30 sec ~ 5 min 调整预变性时间。
- *5: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增退火和延伸反应条件设定为 60°C、30 sec 时可以满足要求; 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, 则可将反应退火和延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增 (三步法 PCR 反应程序可参考附录)。
- *6: 此步骤进行荧光信号采集。

► 实验例

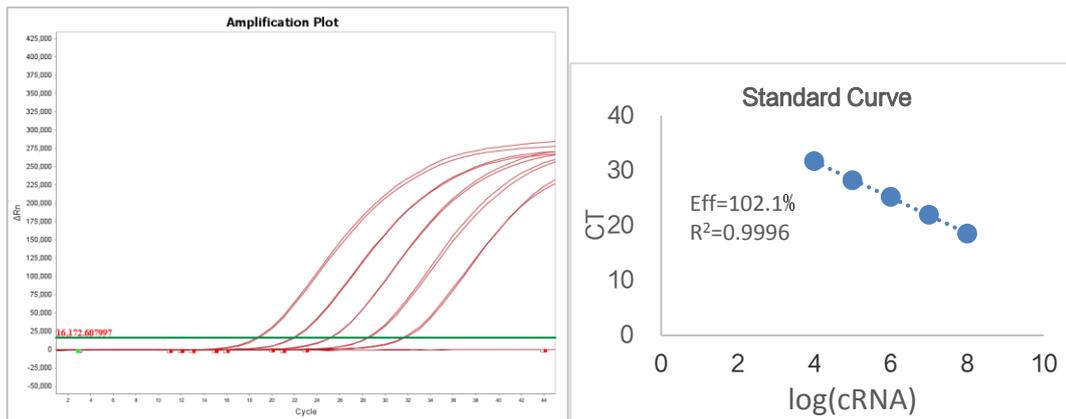
以 293T 细胞 Total RNA (100 ng-10 pg) 为模版, 用 RNase free water 代替模板作为阴性对照, 进行三重检测, 分别为 *TFR* 基因 (GC 含量为 38%, FAM 通道)、*Actin* 基因 (GC 含量为 59%, HEX 通道), *RPP30* 基因 (GC 含量为 62%, CY5 通道)。所用定量仪器为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。实验结果如下:

<FAM 通道>



- 结果如上图所示:
- 1、不同浓度的模板在 45 cycles 以内均能获得良好的扩增。
 - 2、阴性对照在 45 cycles 没有检出。
 - 3、扩增效率为 102.9%, $R^2=0.9994$ 。

<VIC 通道>

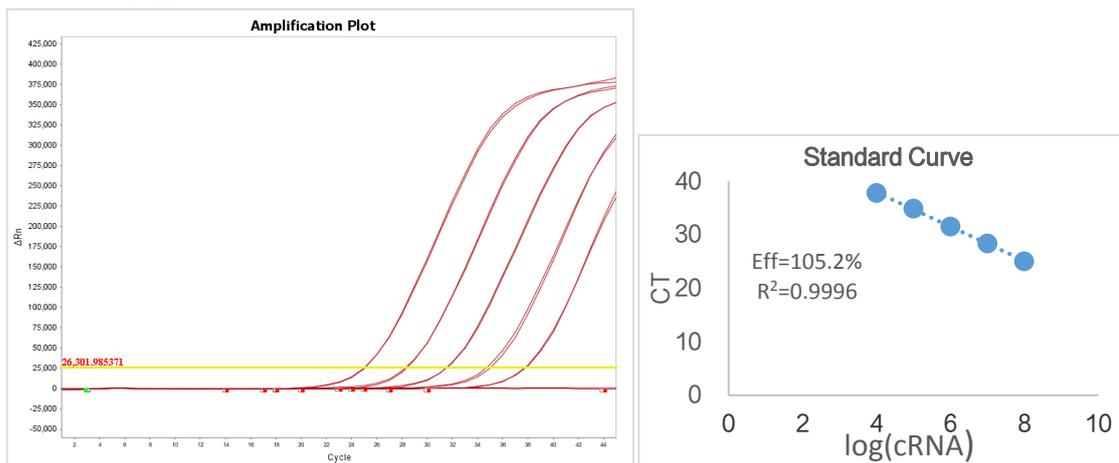


结果如上图所示：1、不同浓度的模板在 45 cycles 以内均能获得良好的扩增。

2、阴性对照在 45 cycles 没有检出。

3、扩增效率为 102.1%， $R^2=0.9996$ 。

<CY5 通道>



结果如上图所示：1、不同浓度的模板在 45 cycles 以内均能获得良好的扩增。

2、阴性对照在 45 cycles 没有检出。

3、扩增效率为 105.2%， $R^2=0.9996$ 。

➤ 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°C，尽量减小两者的 Tm 值差，并使差值不超过 5°C。
 - 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°C，一般控制在 65°C ~ 70°C 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°C	10 min	1
反转录	50°C	15 min	1
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	5 sec	} 45
退火	55°C	30 sec	
延伸 ¹	72°C	30 sec	

1*: 此步骤进行荧光信号采集。