

# AipScript SYBR Green Two-Step qRT-PCR Kit

## 使用说明书

版本号: 240220

产品组成:

Components	QP101-01 (100次*20uL/125次*20uL)
5× AipScript Reaction Mix	400μL
Oligo(dT)(0.5μg/μL)	100μL
Random primer(N6)	100μL
AipMix 2× SYBR Green qPCR SuperMix(Non ROX)	1.25mL
RNase-free Water	1.5mL

**产品储存:** 2-8°C运输, -20°C避光保存, 保质期 24 个月。使用前充分融解混匀, 短期使用可放在 4°C存放 2 周。

**适用范围:** 可用于高拷贝、低拷贝基因的检测。

**制品说明:**

本试剂盒是具有高效合成效率和高扩增效率的两步法荧光定量 PCR 试剂盒。

反转录试剂以 RNA 为模板, 采用预混合技术, 用 5× AipScript Reaction Mix(已经预混合了 AipScript H<sup>-</sup> RTase、RNase Inhibitor、dNTP Mixture、Buffer)快速高效合成第一链 cDNA, 操作简单便捷。采用分子进化技术多点突变的新一代反转录酶, 具有更强的延伸能力和稳定性, 可用于较长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建等。反转录试剂包含合成高质量第一链 cDNA 所需的所有成分, 反转录合成的 cDNA 产物适用于后续的 PCR/qPCR 等实验。用户可根据需要, 选择 Oligo (dT)、Random 或基因特异引物作为反转录引物。后续灵活可选的操作步骤, 既可合成用于克隆的全长 cDNA (可达 20 kb), 又可高效合成用于 qPCR 的各个位置反转录效率均一的 cDNA。

qPCR 试剂是采用 SYBR® Green I 嵌合荧光法进行 Real-Time PCR 的专用预混型试剂。已经将热启动 HotMaster Taq DNA 聚合酶、dNTP、特殊稳定剂、优化的反应缓冲液、BSA 和 SYBR® Green I 等试剂预混成一种适合 Real-Time PCR 反应检测用 2× Premix Type 试剂, 具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。使用时只需加入模板、引物和水, 便可在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线, 对目的基因进行准确定量检测, 重复性好, 可信度高。采用全新的 Hotmaster Taq DNA 聚合酶, 该酶不同于一

般 Hot-start 酶之处在于，一般的 Hot-start 酶只在第一步温度升高之前封闭酶的活性，而 Hotmaster Taq DNA 聚合酶是利用抑制剂通过温度调节方式封闭 Hotmaster Taq DNA 聚合酶的底物结合位点，温度低于 40°C 时，形成非活性的酶-抑制剂复合物，当温度升高至引物特异性的退火温度时，结合平衡向模板-特异性引物复合物形成方向移动，因此最大限度的减少 PCR 扩增全程中的非特异性扩增产物产生，大大提高了荧光定量 PCR 反应的精确性。

qPCR 试剂不含 ROX 参比染料。ROX 主要用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。如需添加请自行购买 ROX Reference Dye (100×) (货号: FP307)，客户可根据 qPCR 仪器技术指导自行决定是否添加和需要添加的浓度。

### 产品特点:

1. 反转录试剂采用新一代反转录酶，大幅度提高了稳定性和反转录效率，合成 cDNA 长度高达 12kb 以上。采用全预混的反转录 Mix，只需加入模板 RNA、引物和水，最快 15 分钟即可简单快速完成反转录实验。反转录预混合 Mix 在 -20°C 不冻结，减少了化冻和混匀时间，使用更简单、更便捷。RNA 模板的体积最多可加到总体积的 75%，非常适合于低浓度 RNA 模板的逆转录。用户可根据需要，灵活选择 Oligo(dT)、Random primer 或基因特异引物作为逆转录引物。
2. qPCR 试剂为全预混 Mix，采用进口原料和特殊工艺批量生产，质量超稳定，批间差极小，扩增效率强，特异性高，灵敏度好，数据准确。

### 第一链 cDNA 合成的引物选择:

1. 如果模板为真核生物来源，一般情况下首选 Oligo(dT)，与真核生物 mRNA 的 3' Poly A 尾配对，可获得最高产量的全长 cDNA。
2. 如果对一些物种，不能确定 mRNA 是否有 poly A 尾的情况下，首选 Oligo(dT)，不成功再尝试基因特异性引物(GSP)和 Random primer 为引物。
3. 基因特异性引物(GSP)的特异性最高。但有些情况下，用于 PCR 反应的 GSP 无法有效引导第一链 cDNA 合成，可改用 Oligo(dT) 或 Random primer 重新进行逆转录。
4. Random primer 特异性最低，所有 RNA，包括 mRNA、rRNA、tRNA 均可以作为 Random primer 的模板。当目标区域具有复杂二级结构或 GC 含量较高，或者模板为原核生物来源，使用 Oligo(dT) 或基因特异性引物(GSP) 无法有效引导 cDNA 合成时，可使用 Random primer 为引物。
5. 如果合成 cDNA 下游用于荧光定量 PCR，可将 Oligo(dT) 与 Random primer 混合使用(各加 1 μL/20 μL 反应体系)，可使 mRNA 的各个区域 cDNA 合成效率相同，有助于提高定量结果的真实性和重复性。

### 第一链 cDNA 合成: (以 20 μL 反应体系为例)

- 加入以下成分(使用前将各溶液轻弹或轻微涡旋混匀, 可短暂离心以收集残留在管壁的液体到管底)

Components	Volume(20uL)
Total RNA/mRNA	50ng-5μg/5-500ng
Oligo(dT)(0.5μg/μL) or Random Primer(0.1μg/μL) or GSP(Gene Specific Primer, 2pmol/μL)	1μL
5× AipScript Reaction Mix	4μL
RNase-free Water	To 20μL

**注:** 5× AipScript Reaction Mix非常粘稠, 溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失, 用前请点甩离心后使用, 并且避免吸头外壁沾附损失。5× AipScript Reaction Mix内包含的酶均为过量, 即使每次按照3.6μL-3.8μL使用, 也不影响使用效果。

- 轻轻混匀。

**注:** 如用Oligo(dT)或基因特异引物(GSP), 42°C孵育30-50 min(如产物用于qPCR, 42°C孵育15 min); 如用Random Primer, 25°C孵育10 min, 42°C孵育30-50 min(如产物用于qPCR, 42°C孵育15 min)。

**注:** 如果模板具有复杂二级结构或高GC区域, 可尝试将反应温度提高至50°C, 有助于提高产量。

- 85°C加热5 sec失活AipScript H<sup>-</sup> RTase。

- 得到的cDNA产物可立即用于PCR反应, 或在-20°C保存, 并在半年内使用; 长期存放建议分装后在-70°C保存。cDNA应避免反复冻融。

■ **RT-PCR:** 建议取1/10-1/5体积(2-4μL)的反转录产物作为PCR模板; 丰度高的可以酌情适当稀释cDNA后使用。

■ **建议PCR条件:** 请按照选择的爱普科学或其它厂家的PCR试剂说明书进行。

■ **建议爱普科学配套PCR试剂:**

常规扩增: GP112-AipMix 2× Taq PCR MasterMix(+Dye)或GP121-AipMix 2× HiFi QuickLong PCR MasterMix(+Dye)

高保真扩增: GP122-AipMix 2× HiFi FastShort PCR MasterMix (+Dye) 或 GP123-AipMix 2× HiFi FastLong PCR MasterMix (+Dye)

**建议PCR条件:** (以20μL和50μL反应体系为例, 反应液配制请在冰上进行)

Components	Volume(20μL)	Volume(50μL)	Final Concentration
2× SYBR Green qPCR Mix (Non ROX)	10μL	25μL	1×
DNA Template	2μL	4μL	as required

Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M each
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M each
ddH <sub>2</sub> O to final volume	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L	Not applicable

**PCR 循环(二步法):**

95°C: 2 min

95°C: 15 sec

60°C: 30-34 sec

Dissociation Stage



40 cycles

**PCR 循环(三步法):**

95°C: 2 min

95°C: 15 sec

60°C: 15-20 sec

72°C: 20-30 sec

Dissociation Stage



40 cycles

**说明:** 本制品兼容性强, 适用于不同厂家、型号的荧光定量PCR仪, 绝大多数情况下使用二步法和三步法均可获得良好效果。在实际使用中可以根据机型推荐和具体情况对程序加以微调。一般来说, 二步法扩增特异性高, 三步法扩增效率高。如果融链曲线较差, 可以尝试两步法扩增; 若因使用T<sub>m</sub>值较低的引物等原因, 得不到良好的实验结果时, 可尝试加长延伸时间或者进行三步法PCR扩增。

**注意事项:**

1. 操作中注意避免RNase污染, 为保证反转录成功, 建议使用高质量的RNA模板。
2. **可选步骤(一般不需要):** 如果RNA模板GC含量丰富或者有复杂二级结构、或者扩增cDNA长度超过3kb, 可以先只加RNA模板、引物和RNase-free Water混匀, 65°C变性5分钟, 冰上冷却, 短暂离心后加入其它成分继续下面的反转录步骤。
3. qPCR试剂在使用前请轻柔的上下颠倒混匀后进行使用, 也可将预混合试剂经短暂离心后混匀进行使用。请勿漩涡振荡混匀, 避免产生过量气泡, 影响定量结果。
4. qPCR试剂含SYBR® Green I 强光下易分解和降低敏感度, 保存和使用时应避免长时间强光照射。建议在冰上配制PCR反应液, 再放入PCR仪器中扩增, 可以提高扩增特异性, 减少背景。
5. qPCR试剂含有4mM MgCl<sub>2</sub>(反应体系终浓度是2mM Mg<sup>2+</sup>), 可用25mM MgCl<sub>2</sub>优化Mg<sup>2+</sup>浓度。

=====

