

AipScript Plus SYBR Green Two-Step qRT-PCR Kit (OneStep gDNA Removal)

使用说明书

版本号: 240220

产品组成:

Components	QP103-01 (100次*20uL/125次*20uL)
5× AipScript Reaction Mix	400μL
gDNA Remover	100μL
Oligo(dT)(0.5μg/μL)	100μL
Random primer(N6)	100μL
AipMix 2× SYBR Green qPCR SuperMix(Universal 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⁻ 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。本试剂盒中使用了具有 DNA 分解活性的特殊 gDNA Remover, 只需一步操作, 即可同时完成基因组清除与逆转录反应, 极大的简化了实验操作步骤, 避免了复杂加样过程中造成的污染与 RNA 降级的风险。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 试剂已加入特殊的通用 ROX 参比染料，具有高通用性，适用于所有型号的 qPCR 仪器，无需在另外添加 ROX，也无需在不同的仪器上调整 ROX 的使用浓度，操作更简单更便捷，即可快速高效的进行 qPCR 扩增。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。

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，并配备了先进的 gDNA Remover 一步法基因组清除技术，只需一步同时加入 gDNA Remover、模板 RNA、引物和水，实现 cDNA 合成和去除基因组 DNA 同时进行，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 μ L/20 μ L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 μ L反应体系为例)

1. 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(20 μ L)
Total RNA/mRNA	50ng-5 μ g/5-500ng
Oligo(dT)(0.5 μ g/ μ L) or Random Primer(0.1 μ g/ μ L) or GSP(Gene Specific Primer, 2pmol/ μ L)	1 μ L
5 \times AipScript Reaction Mix	4 μ L
gDNA Remover	1 μ L
RNase-free Water	To 20 μ L

注 如果反转录时不需要去除基因组DNA，直接略去gDNA Remover成分不加即可。gDNA Remover每次按照0.8 μ L-0.9 μ L使用，也不影响使用效果。

注：5 \times AipScript Reaction Mix和gDNA Remover含甘油非常粘稠，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 \times AipScript Reaction Mix内包含的酶均为过量，即使每次按照3.6 μ L-3.8 μ L使用，也不影响使用效果。

2. 轻轻混匀

注：如用Oligo(dT)或基因特异引物(GSP)，42 $^{\circ}$ C孵育30-50 min(如产物用于qPCR，42 $^{\circ}$ C孵育15 min)；如用Random Primer，25 $^{\circ}$ C孵育10 min，42 $^{\circ}$ C孵育30-50 min(如产物用于qPCR，42 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C，有助于提高产量。

3. 85 $^{\circ}$ C加热5 sec失活AipScript H⁻ RTase。
4. 得到的cDNA产物可立即用于PCR反应，或在-20 $^{\circ}$ C保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-70 $^{\circ}$ C保存。cDNA应避免反复冻融。

■ **RT-PCR:** 建议取1/10-1/5体积(2-4 μ L)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 \times Taq PCR MasterMix(+Dye)或GP121-AipMix 2 \times HiFi QuickLong PCR MasterMix(+Dye)

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

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

Components	Volume(20 μ L)	Volume(50 μ L)	Final Concentration
2 \times SYBR Green qPCR Mix (Universal ROX)	10 μ L	25 μ L	1 \times
DNA Template	2 μ L	4 μ L	as required
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ L	1 μ L	0.2 μ M each
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ L	1 μ L	0.2 μ M each
ddH ₂ O to final volume	20 μ L	50 μ 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_m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 MgCl₂(反应体系终浓度是2mM Mg²⁺)，可用25mM MgCl₂优化Mg²⁺浓度。

=====

