



## GENESEED® circRNA qRT-PCR Kit

### 产品概要

本产品的试剂是使用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 的专用试剂。配合针对 qPCR 优化的最适 Buffer，可以有效抑制非特异扩增，显著提高扩增效率，适用于进行高灵敏度的 qPCR 反应。

### 产品组成

组分	GS0203-1 (300 rxns qPCR)	GS0203-2 (500 rxns qPCR)	GS0203-3 (1000 rxns qPCR)
2× qPCR SYBR Green Master Mix	1.0 mL×3	1.0 mL×5	1.0 mL×10

### 储藏与保质期

本产品应置于-20℃，有效期 1 年。使用过程中请尽量避免反复冻融。

### 实验操作注意事项

- 使用前请上下颠倒混匀，请勿 vortex 以免产生过多气泡引起反应体系失准，进而影响定量结果。混匀后轻微离心后即可使用。如操作不慎产生气泡，请再次离心后使用。
- 由于产品中的 2× qPCR SYBR Green Master Mix 含有荧光染料 SYBR Green I，因此无论保存 Mix 还是配制反应体系时,都应该尽量避免强光照射。

### 操作方法 (以 ABI 7500 为测试机型)

用 ABI PRISM 7000/7700/7900HT、7300 System、7500 System 的操作方法；请按照 Applied Biosystems 公司的仪器使用说明书要求进行实验操作（其他类型的荧光定量 PCR 仪器请按照说明书操作）。

#### a. 按下列组分配制 PCR 反应液：

试剂名称	使用量
2× qPCR SYBR Green Master Mix	10μL
Forward Primer (10μM)	0.5μL
Reverse Primer (10μM)	0.5μL
cDNA	1μL
RNase free H <sub>2</sub> O	8μL
Total	20μL



## b. 进行 Real Time PCR 反应

Stage1	预变性	循环数: 1	95°C	5min
Stage2	PCR 反应 <sup>a</sup>	循环数: 40	95°C	10sec
			60°C	30sec
			95°C	15sec
Stage3	融解曲线 <sup>b</sup>	循环数: 1	60°C	60sec
			95°C	15sec
			95°C	15sec

延伸时间请根据您使用的 Real-time PCR 仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用 ABI 7700 和 7900HT 时至少 30 sec；使用 ABI 7000 和 7300 时至少 31 sec；使用 ABI 7500 时至少 34 sec；使用 ABI StepOnePlus 时至少 10 sec。

b. 仪器类型不同，融解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

## 常见问题与解决方案

### 1. CT 值出现太晚或检测为阴性

- 扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序。
- 模板浓度太低：减少稀释度重复试验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- 模板降解：重新制备模板，重复试验。

### 2. 反应结束无扩增曲线出现

- circRNA 在细胞株或组织中不表达：更换模板。
- 反应循环数不够：一般设置循环数为 40，但需要注意的是过多的循环数会增加过多的背景信号，降低数据可信度。
- 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段；三步法扩增程序应当将信号采集设置在 72°C 延伸阶段。
- 模板浓度太低：减少稀释度重复试验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- 模板降解：重新制备模板，重复试验。

### 3. 阴性对照也出现明显扩增

- 反应体系或水被污染：更换新的 Mix 或者水重复试验。反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染。

### 4. 实验重复性差

- 加样体积失准：使用性能较好的移液枪，扩大反应体积，将模板做高倍稀释，以大体积加入反应体系中。
- 定量 PCR 仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。
- 模板浓度太低：模板浓度越稀，重复性越差，减少模板稀释度或提高加样体积。

### 5. 本产品是否可以 4°C 储存

- 不可以。4°C 储存将会导致产品活性下降。
- 该产品 -20°C 储存可以长期保持活性，推荐 -20°C 储存。
- 因反复冻融也可能导致产品活性下降，因此当每次用量较小时，推荐小体积分装后 -20°C 储存。