



## GENESEED® circRNA qRT-PCR Kit

### 产品概要

本产品包含逆转录及环状 RNA 的定量 PCR 检测试剂。提取得到总 RNA 或环状 RNA 即可应用本产品完成环状 RNA 的定量 PCR 检测。

本产品的 TransScript RT Enzyme (M-MLV) 是在 M-MLV(RNase H-)Reverse Transcriptase 基础上通过体外分子进化技术获得的全新逆转录酶。大幅提高了热稳定性，在 50°C 的半衰期超过 240 分钟，并可在 55°C 长时间反应而保持稳定，非常适合具有复杂二级结构的 RNA 模板的逆转录。定量 PCR 检测的试剂是使用 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	Cat.No.GS0201 (50rxns RT+500rxns qPCR)
TransScript RT Enzyme(M-MLV)	100 $\mu$ L
Reverse Transcription Primer	100 $\mu$ L
5 $\times$ RT Buffer	200 $\mu$ L
2 $\times$ qPCR SYBR Green Master Mix	1 mL $\times$ 5
RNase-Free H <sub>2</sub> O	1 mL

### 储藏与保质期

本产品应置于-20°C条件保存，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

1. 本产品尽量避免反复冻融，以免酶活下降。如每次使用量较少，推荐小份分装使用。
2. 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。
3. 由于产品中的 2 $\times$  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)

### 1. 逆转录

#### a. 配制第一链 cDNA 合成反应液

在 RNase free 离心管中配制如下混合液:

试剂名称	使用量
5× RT Buffer	4μL
TransScript RT Enzyme(M-MLV)	2μL
Reverse Transcription Primer	2μL
Total RNA	10pg ~ 1μg
RNase-Free H <sub>2</sub> O	to 20μL

用移液器轻轻吹打混匀。

#### b. 按下列条件进行第一链 cDNA 合成反应

温度	时间
25°C	10min
42°C	30min
85°C	5min

\*如果模板具有复杂二级结构或高 GC 区域, 可将反应温度提高至 50°C, 有助于提高产量。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 -80°C 保存。cDNA 应避免反复冻融。

### 2. 实时定量 PCR 检测

用 ABI PRISM 7000/7700/7900HT、7300System、7500System 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
Stage3	融解曲线 <sup>b</sup>	循环数: 1	95°C	15sec
			60°C	60sec
			95°C	15sec

a. 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, 熔解曲线采集程序不尽相同, 使用仪器默认熔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

- a) 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。
- b) 定量 PCR 仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。
- c) 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℃ 储存

- a) 不可以，4℃ 储存将会导致产品活性下降。
- b) 该产品 -20℃ 储存可以长期保持活性，推荐 -20℃ 储存。
- c) 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℃ 储存。