HotScript SYBR Green Two-Step qRT-PCR Kit

使 用 说 明 书

包 装 量：

目录编号	包装单位
QP102-01	**RT312-01 和 FP301-01**
QP102-02	**RT312-02 和 FP301-01**

试剂盒组成	货号	产品规格
HotScriptcript First-Strand cDNA Synthesis RT-PCR Kit	RT312-01	50 次*20uL
	RT312-02	100次*20uL
AipMix 2× SYBR Green qPCR SuperMix	FP301-01	125次*20uL

产品储存：－20℃储存，有效期 12 个月。

产品说明：本产品由两个试剂盒组合而成。

一个是：第一链耐热反转录试剂盒 HotScript First-Strand cDNA Synthesis RT-PCR Kit(RT312)。

一个是：AipMix 2× SYBR Green qPCR SuperMix。

首先由反转录第一链试剂盒合成 cDNA，然后以 cDNA 做模板用 2x SYBR Green qPCR Mix 进行荧光定量 PCR 扩增。

使用说明：请按照上述两个试剂详细步骤说明进行实验。

RT312使用说明书

包 装 量：

目录编号	包装单位
RT312-01	**50次*20uL**
RT312-02	**100次*20uL**

Components	RT312-01	RT312-02
5× HotScript Reaction Mix	200μL	400μL
Oligo(dT)(0.5μg /μL)	50μL	100μL
Random primer(N6)	50μL	100μL
RNase free Water	1mL	1.5mL

产品储存：－20℃保存，有效期 12 个月。

制品说明：

本制品以 RNA 为模板，采用预混合技术，用 5× HotScript Reaction Mix(已经预混合了 HotScript H⁻ RTase、RNase Inhibitor、dNTP Mixture、Buffer)高效合成第一链 cDNA，操作简单。

本制品采用分子进化技术高达 60℃的全新高温反转录酶，可以通读 GC 含量丰富，二级结构复杂的 RNA 模板，极大提高反转录效率和长度。可用于更长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建等。

适用范围：第一链cDNA合成。可用于高拷贝、低拷贝基因的检测。尤其GC含量高，复杂模板的高温反转录。

产品特点：

1. 新一代高温反转录酶极大提高了包括复杂RNA模板的反转录效率和长度。合成cDNA长度高达15kb以上。
2. 全预混的反转录Mix，只需加入RNA、引物和水，简单快速完成反转录。
3. 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模板的逆转录反应。

4. 预混合Mix在-20℃不冻结，减少了化冻和混匀时间，使用更简单。
5. 用户可根据需要，可灵活选择Oligo(dT)、Random primer或基因特异引物作为逆转录引物。

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polyA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1μL/20μL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20μL反应体系为例)

1. 加入以下成分(使用前将每种溶液轻弹或者轻微涡旋振荡混匀，可简短离心收集液体到管底。)

Components	Volume
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× HotScript Reaction Mix	4μL(见注意事项 4)
RNase free Water	to 20μL(补足到总体积 20μL)

2. 轻轻混匀

   如用Oligo(dT)或基因特异引物(GSP)，50℃孵育30-50 min(如产物用于qPCR，50℃孵育15 min)。

   如用Random Primer，25℃孵育10 min，50℃孵育30-50 min(如产物用于qPCR，50℃孵育15 min)。

   注意：本制品在42℃-60℃反转录均有稳定良好效果。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55℃-60℃，有助于提高产量。
3. 85℃加热5 sec失活HotScript H^- RTase。
4. 得到的cDNA产物可立即用于PCR反应，或在-20℃保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-70℃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PCR试剂或者其它厂家PCR试剂说明书进行。

建议爱普科学配套PCR试剂：

1. 常规扩增：GP127-AipMix 2× Taq PCR MasterMix(+Dye)
   GP124-AipMix 2× F8 FastLong PCR MasterMix(+Dye)
2. 高保真扩增：GP111-AipMix 2× A8 FastHiFi PCR MasterMix(+Dye)
   GP112-AipMix 2× A9 LongHiFi PCR MasterMix(+Dye)

注意事项：

1. 避免RNase污染。
2. 为保证反转录成功建议使用高质量的RNA样品。
3. **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、引物和和RNase free Water混匀，65℃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。
4. 5× HotScript 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× HotScript 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。

FP301使用说明书：

包 装 量：

目录编号	包装单位	产品规格
FP301-01	1.25mL	125次*20uL

产品储存：-20℃避光保存，有效期 24 个月；使用前充分融解混匀；短期使用可放在 4℃，避免反复冻融。

制品说明：

本制品本制品是采用 SYBR® Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。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和引物和水，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。

本品采用全新的 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℃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。

注意事项：

1. 本制品不含参比染料ROX，客户须根据qPCR仪器技术指导决定是否需要加入ROX参比染料，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，配套参比染料为：ROX Reference Dye(100×)(货号：FP307)。
2. 本制品含SYBR® Green I 强光下易分解，降低敏感度，使用时避免长时间强光照射本制品。
3. 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。
4. 本制品含有4mM $MgCl_2$(反应体系终浓度是2mM Mg^{2+})，可用25mM $MgCl_2$ 优化Mg^{2+}浓度。

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 qPCR Mix	10μL	25μL	1×
DNA Template	1μL	2μL	as required
Forward Primer (10μM)	0.4μL	1μL	0.2μM each
Reverse Primer (10μM)	0.4μL	1μL	0.2μM each
ddH_2O to final volume	20μL	50μL	Not applicable

PCR循环(二步法)：

95℃: 2 min
95℃: 15 sec
60℃: 30-34 sec
40 cycles
Dissociation Stage

PCR循环(三步法)：

95℃: 2 min
95℃: 15 sec
60℃: 15-20 sec
72℃: 20-30 sec
40 cycles
Dissociation Stage

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Tm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。

荧光定量PCR实验常见问题和解决方案：

A1：无信号值出现

Q1：

1. 反应循环数不够。一般都要在 35 个循环以上，可根据实验情况增加循环(如至 45cycles)，但高于 45 个循环会增加过多的背景信号。
2. 检测荧光信号的步骤有误。一般 SG 法采用 72℃延伸时采集，Taqman 法则一般在退火结束时或延伸结束采集信号。

3. 引物或探针降解。可通过 PAGE 电泳检测其完整性。
4. 引物或探针的设计，如探针高于引物的温度不够，造成探针未杂交上而产物已延伸的情况。
5. 模板量不足。对未知浓度的样品应从系列稀释样本的最高浓度做起。
6. 模板降解。避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。

A2：CT 值出现过晚

Q2：

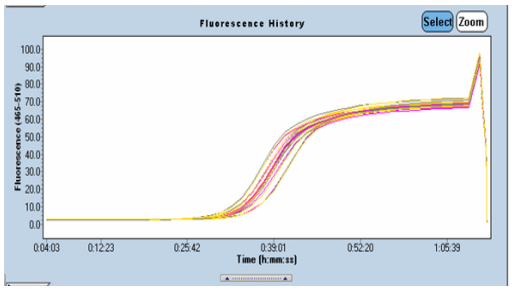
1. 扩增效率低，反应条件不够优化。设计更好的引物或探针；用三步法进行反应；适当降低退火温度；增加镁离子浓度等。
2. PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足。
3. PCR 产物太长。一般采用 100-150bp 的产物长度，一般不超过 500bp。

A3：标准曲线的线性关系不佳

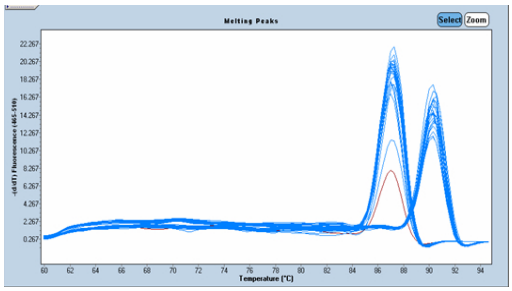
Q3：

1. 加样存在误差，使得标准品不呈梯度。
2. 标准品出现降解。应避免标准品反复冻融，或重新制备并稀释标准品。
3. 引物或探针不佳。重新设计更好的引物和探针。
4. 模板中存在抑制物，或模板浓度过高。

典型扩增曲线和融链曲线图(使用本制品在 Roche Light Cycler 480 II 三步法操作实际图片)



扩增曲线



融链曲线

扫码关注我们