

产品简介

riboSCRIPT™ mRNA/lncRNA qRT-PCR Starter Kit 是研究基因表达变化的通用检测方法。然而,与 mRNA 不同的是, lncRNA 表达水平相对较低, 通常需要进行多个要素的系统优化才能准确地检测分析。riboSCRIPT™ mRNA/lncRNA qRT-PCR Starter Kit 是锐博生物推出的基于 SYBR Green I 嵌合荧光法的 qRT-PCR 试剂盒, 其包含已优化浓度的 RT 酶, Taq 酶, 缓冲液, SYBR Green I 荧光染料, RT 引物和内参 qPCR 引物, 仅需结合推荐浓度的 qPCR 引物即可实现 mRNA 或 lncRNA 表达情况的快速、高效、准确的检测。

表 1 试剂盒组成内容

Reagent (In tube)	C11030-1	C11030-2	C11030-3
	(20T RT+60T qPCR)	(100T RT+300T qPCR)	(500T RT+1500T qPCR)
RTase Mix	40 μ L	200 μ L	1mL
5X Reverse Transcription Buffer	40 μ L	200 μ L	1mL
2X SYBR Green Mix	600 μ L	3mL	15mL
Random Primer (200 μ M)	20 μ L	100 μ L	500 μ L
Oligo (dT) ₁₈ (25 μ M)	20 μ L	100 μ L	500 μ L
GAPDH (h,m,r) qPCR Forward Primer (10 μ M)	50 μ L	250 μ L	1250 μ L
GAPDH (h,m,r) qPCR Reverse Primer (10 μ M)	50 μ L	250 μ L	1250 μ L
RNase-free Water	1mL	5mL	25mL

运输保存

产品需**低温运输**。收到产品后, 请于-20℃保存, 可以稳定保存一年。

使用前须知

使用前请瞬时离心, 以免制品粘附于管壁或管盖上, 造成损失或污染。

血浆/血清/分泌体的 mRNA/lncRNA qPCR 检测需要在提取 RNA 前加入外参。

实验方法

1. mRNA/lncRNA RT 反应

- 1) 取 Random Primer (200 μM) 和 Oligo (dT)₁₈ (25 μM)，恢复至室温，振荡混匀。
- 2) 推荐以 10 μL RT 反应体系进行实验：

Reagent	10 μL 体系	终浓度
RNA Template(1 μg)	x μL	
Random Primer (200 μM)	1 μL	20 μM
Oligo (dT) ₁₈ (25 μM)	1 μL	2.5 μM
5X Reverse Transcription Buffer	2 μL	1X
RTase Mix	2 μL	
RNase-free Water	至 10 μL	

以上体系混匀后，瞬时离心，RT 反应程序为：42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min，70 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

注：1) Random Primer 和 Oligo (dT)混合使用，可以高效合成 cDNA。实验目的不同，也可以用单引物或者基因特异性 RT 引物，使用量如下：

引物	使用量	终浓度
Random Primer (200 μM)	1 μL	20 μM
Oligo (dT) ₁₈ (25 μM)	1 μL	2.5 μM
基因特异性 RT 引物(5 μM)	1 μL	500nM

- 2) RT 反应结束后请立即将 cDNA 产物取出，快速置于冰上冷却备用或-20 度以下保存；
- 3) 体系可按照实验需求等比放大，20 μL 反应体系建议不超过 5 μg 的 Total RNA。

2. mRNA/lncRNA qPCR 反应

- 1) SYBR Green Mix: 包括 Taq 酶、dNTP mix、PCR Buffer、SYBR Green I 等。

推荐以 20 μL qPCR 反应体系进行实验：

Reagent	20 μL 体系	终浓度
2X SYBR Green Mix	10 μL	1X
RT Product	2 μL	
Ribo TM mRNA/lncRNA Forward Primer (5 μM)	0.8 μL	200nM
Ribo TM mRNA/lncRNA Reverse Primer (5 μM)	0.8 μL	200nM
ddH ₂ O	至 20 μL	

注：1) 正反向引物初始反应浓度推荐使用 200nM，最佳浓度可以在 100nM~500nM 之间优化；

2) 本试剂盒不含 ROX 染料，使用 ABI PRISM[®] 7000/7700/7900HT, 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 等需额外添加 ROX 染料作为校正荧光的仪器，请用户自行准备所需的 ROX 染料。不同仪器对 ROX 染料的用量需求不一，请根据仪器的使用说明进行添加；

3) DNA 最高使用量不能超过 qPCR 反应体系的 1/10, 对于表达丰度较高的 mRNA/lncRNA, 可将 cDNA 稀释后再进行 qPCR, 稀释比例可以在 10~1000 倍之间, 请根据具体的 Ct 值进行调整。

2) 建议使用标准三步法进行检测, 请在定量 PCR 仪 (以 Bio-Rad CFX96 为例) 上设定如下程序:

循环	步骤	温度	时间	内容
1 X	预变性	95°C	10min	Taq 酶激活
40 X	变性	95°C	5sec	PCR 模板变性
	退火	60°C	30sec	退火
	延伸	72°C	30sec	延伸 (收集信号)

注: 1) 关于退火温度的设定, 通用退火温度为 60°C, 最佳退火温度需考虑引物的 Tm 值, 在 57°C~63°C 之间适当调整;

2) 部分仪器如 ABI 系列仪器收集荧光信号需要较长的恒温时间方能收集信号, 使用此类仪器请将反应程序更改为两步法, 将退火及延伸反应合并, 退火延伸温度设置为 60°C, 时间设置为仪器收集信号所需的最短时间。

3) 对于用 SYBR Green I 染料法进行的 qPCR 检测反应都需要在循环结束后立即进行熔解曲线分析, 检测温度为 70°C~95°C, 升温速率为 0.5°C/次, 恒温时间为 5 sec/次。

相关产品

产品编号	产品名称
Variant*	genDETECT TM Gene_qPCR_Primer
Variant*	lncDETECT TM lncRNA_qPCR_Primer
Variant*	Ribo TM lncRNA Smart Silencer
Variant*	Ribo TM lncRNA ChIRP-Probe
C11027-2	riboSCRIPT TM Reverse Transcription Kit
C00110-20µL	Random Primer (200µM, 20µL)
C00111-20µL	Oligo (dT)18 Primer (25µM, 20µL)

注: *.根据 mRNA/lncRNA 不同或/和规格不同编号不同。

FAQ

1. 引物非特异扩增怎么办？

答：在合理的 Ct 值范围内（15~30，数据稳定性好的 30-35）出现熔解曲线有杂峰的现象，建议做如下改进：

- 1) 使用更合适的扩增条件（控制延伸时间，提高退火温度）；
- 2) 确认 RNA 模板质量，使用高质量高完整度的 RNA 模板。

2. 无扩增信号是不是引物不行？

答：只要引物序列能够跟目的模板序列匹配上，基本可以扩增，建议做如下改进或检测：

- 1) 使用合适的反应体系及程序；
- 2) 使用阳性对照样品（如对应基因过表达质粒）进行逆转录及 qPCR；
- 3) 如若反应体系、程序和引物都没有问题，很有可能是目的 RNA 在实验模型中表达丰度很低或不表达，建议更换实验模型。

3. 阴性样品有信号是不是引物问题？

答：具体 Ct 值分析对样品扩增信号有没有影响，若有影响，处理同引物非特异扩增。

4. RT 前是否可以对 RNA 进行高温变性处理？

答：高温变性处理主要是为了打开 RNA 的二级结构，可以在 RT 前将 RNA 在 70℃ 中变性 10min，然后冰浴 2min 再进行 RT 反应。

5. qPCR 的设定程序中预变性 10min 时间太长，是否可以缩短？

答：预变性时长主要是根据 Taq 酶的热激活时间设定，我们的试剂盒采用的是化学修饰的 Taq 酶，热激活时长较长，不能缩短；如果采用其他 Taq 酶（如抗体修饰的 Taq 酶），热激活时间可能较短。请严格按照具体使用的 qPCR 试剂盒/Taq 酶使用说明书进行操作。