



circRNA qRT-PCR Kit

Cat.No.GS0201

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℃ 的半衰期超过 240 分钟，并可在 55℃ 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	GS0201 (50 rxn RT+500 rxn qPCR)
TransScript RT Enzyme (M-MLV)	100 μ L
Reverse Transcription Primer	100 μ L
5 $\times$ RT Buffer	200 μ L
2 $\times$ qPCR SYBR Green Master Mix	5 mL
RNase free H2O	1 mL

储藏与保质期

本产品应置于-20℃避光保存；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×qPCR SYBR Green Master Mix 含有荧光染料 SYBR Green I，因此无论保存 Mix 还是配置反应体系时都应该尽量避免强光照射。

操作方法

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	4 μL
TransScript RT Enzyme (M-MLV)	2 μL
Reverse Transcription Primer	2 μL
Total RNA	10 pg-1 μg
RNase free H ₂ O	to 20 μL
Total	20 μL

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

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、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. 按下列组分配置 PCR 反应液：

试剂名称	使用量
2×qPCR SYBR Green Master Mix	10 μ L
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ L
DNA 模板	1 μ L
RNase free H ₂ O	8 μ L
Total	20 μ L

b. 进行 Real Time PCR 反应

Stage1：预变性 95℃，5min；

Stage2：PCR 反应

95℃，10s，

60℃ 30~34s，

40 cycles；

退火温度根据引物来设定。

使用 7700 和 7900HT 时请设定在 30s。

使用 7000 和 7300 时请设定在 31s。

使用 7500 时请设定在 34s。

Stage3：融解曲线

95℃ 1min，

55℃ 1min，

55℃-98℃（10s/cycle 0.5℃/cycle）



常见问题与解决方案

1. CT 值出现太晚或检测为阴性
 - a) 扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序。
 - b) 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。
 - c) 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
 - a) circRNA 在细胞株或组织中不表达：更换模板。
 - b) 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，降低数值可信度。
 - c) 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℃ 延伸阶段。
 - d) 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。
 - e) 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
 - a) 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置，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。