

版本号: FP170801

InRcute IncRNA qPCR Detection Kit (SYBR Green)

InRcute IncRNA荧光定量检测试剂盒 (SYBR Green)

目录号: FP402

产品内容

产品组成	FP402-01 20 μ l \times 125 rxn	FP402-02 20 μ l \times 500 rxn
2 \times InR IncRNA Premix (with SYBR Green I)	1.25 ml	4 \times 1.25 ml
50 \times ROX Reference Dye	250 μ l	1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	5 \times 1 ml

储存条件

收到本产品后, 请立即置于-20 $^{\circ}$ C保存。从-20 $^{\circ}$ C取出使用时, 将冻存的2 \times InR IncRNA Premix和ROX Reference Dye融解, 然后轻轻颠倒混匀, 待溶液完全均一后再行使用。如解冻后没有使用, 须彻底混匀后重新冷冻(在解冻过程中盐会出现分层现象, 未混匀进行冷冻, 盐晶体的析出将会对酶造成损害)。如需一段时间内经常取用, 可在2-8 $^{\circ}$ C条件下储存3个月。避免反复多次冻融。本产品在-20 $^{\circ}$ C下可保存1年。

产品简介

本试剂盒采用SYBR® Green I嵌合荧光法的原理进行lncRNA的荧光定量检测。试剂盒包含lncRNA荧光定量检测的所有试剂，包括2×lnR lncRNA Premix、50×ROX Reference Dye和RNase-Free ddH₂O。可对目标lncRNA进行快速、特异性的定量检测。

与mRNA相比，lncRNA具有丰度低、GC含量差异大、二级结构更复杂等特性，传统定量试剂对lncRNA难以达到理想的效果。本试剂盒中的2×lnR lncRNA Premix是专门为lncRNA定量检测而研发的新一代预混形式的荧光定量PCR检测试剂，其中的DNA Polymerase采用的是抗体修饰的热启动形式，配合特殊优化的Buffer体系，可确保本产品在保证较高的反应特异性的情况下具有更高的检测灵敏度。此外，Buffer中添加了H-competitor因子和EP组分，使得本产品具有广泛的样本普适性，对不同GC含量的模板、具有复杂高级结构的模板、PCR抑制剂残留较多的模板以及长片段模板等具有非常好的扩增适用性，特别适合高级结构相对复杂，整体丰度相对较低的lncRNA的定量检测。此外，优化的预混液可缩短Real-Time PCR的反应时间，适用于标准或快速定量的PCR反应。

试剂盒特点

- 操作简便。**2×lnR lncRNA Premix中预混有SYBR Green I，PCR反应液配制时，只需加入模板、引物、灭菌蒸馏水便可进行快速Real-Time PCR反应，操作简单方便。
- 普适性好。**本产品中特别添加了H-Competitor因子，能够竞争氢键、增强双链的打开程度，使本产品具有广泛的样本普适性，对具有复杂高级结构的模板和长片段扩增等具有非常好的适用性。
- 性能卓越。**本产品特制的快速PCR Buffer体系含有独特的PCR稳定因子——EP，能够有效保护酶活，抵御各种PCR抑制剂的干扰，保证了2×lnR lncRNA Premix具有高扩增效率、高扩增特异性、高扩增灵敏度和宽广的可信范围的特点。
- 定量准确。**本产品附带ROX Reference Dye，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，方便客户针对不同型号荧光定量PCR仪时选择对应浓度使用。
- 稳定性好。**2×lnR lncRNA Premix采用无色透明管包装，经检测，光照不会影响体系的定量的结果。

注意事项

- 如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。使用时请上下颠倒轻轻混匀，请不要使用振荡器进行混匀，尽量避免出现泡沫，并经瞬时离心后使用。
 - 引物纯度对反应特异性影响很大，建议使用PAGE级别以上纯化的引物。
 - 20 μl反应体系中，cDNA模板的使用量一般小于100 ng，基因组DNA模板量一般小于50 ng，反转录产物作为模板时，使用量应不超过PCR体系终体积的10%。
-

操作方法

<1> 建立Real-Time PCR反应体系

请注意将50 × ROX Reference Dye避光保存。

1. 融解2 × InR IncRNA Premix (如果保存在-20℃), ROX Reference Dye, 模板, 引物和RNase-Free ddH₂O, 并将所有试剂在室温下溶解并彻底混匀。
2. 建议置于冰上进行Real-Time PCR反应液的配制。

反应体系:

组成成分	50 μl 体系	25 μl 体系	20 μl 体系	终浓度
2 × InR IncRNA Premix	25 μl	12.5 μl	10 μl	1 ×
正向引物 (10 μM)	1.25 μl	0.625 μl	0.5 μl	0.25 μM*
反向引物 (10 μM)	1.25 μl	0.625 μl	0.5 μl	0.25 μM*
cDNA模板	—	—	—	-ng-pg
50 × ROX Reference Dye [△]	—	—	—	—
RNase-Free ddH ₂ O	至50 μl	至25 μl	至20 μl	—

* 引物终浓度为0.25 μM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时, 可增加PCR反应体系中的引物浓度; 发生非特异扩增时, 可适当减少PCR反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的, 可以在0.2-0.5 μM范围内调整。

[△] 几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表:

仪器	终浓度
ABI 5700/7000/7300/7700/7900HT/ StepOne™/ StepOne Plus™	5 × (例如: 5 μl ROX/50 μl体系)
ABI 7500、7500 Fast、ViiA 7、QuantStudio™、 12K Flex; Agilent Mx3000P、Mx3005P和Mx4000	1 × (例如: 1 μl ROX/50 μl体系)
Roche仪器, Bio-Rad仪器, Eppendorf仪器等	无需添加

<2>进行Real-Time PCR反应

建议采用两步法PCR反应程序进行反应; 若模板量较低等因素导致扩增效果不佳, 可使用三步法程序进行PCR反应。

两步法反应程序:

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1 ×	95°C	3 min	预变性	否
PCR反应	40 ×	95°C	5 sec	变性	否
		60°C ^{△1}	15 sec ^{△2}	退火/延伸	是
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)					

三步法反应程序:

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1 ×	95°C	3 min	预变性	否
PCR反应	40 ×	95°C	5 sec	变性	否
		50-60°C ^{△3}	10 sec	退火	否
		72°C	15 sec ^{△2}	延伸	是
		熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)			

^{△1} 请先使用60°C 15 sec进行扩增。如果需要进一步优化, 可以尝试在56-66°C 范围内进行。

^{△2} 使用不同型号仪器进行时间设定时, 请按照仪器使用说明书要求进行实验操作, 几种常见仪器的时间设定见下表:

使用ABI 7700/7900HT/7500 Fast/ViiA 7, Roche, BioRad和Agilent等公司荧光定量PCR仪时, 请设定在15 sec。

使用ABI 7000和7300时请设定在31 sec。

使用ABI 7500时请设定在32 sec。

^{△3} 通常引物退火温度比引物的解链温度(T_m)低5°C, 如果引物碱基数较少, 可以适当提高退火温度, 这样可以使PCR的特异性增加; 如果碱基数较多, 那么可以适当减低退火温度。

3. 盖上反应管, 轻柔混匀。可短暂离心, 确保所有组分均在管底。

4. 将反应体系置于荧光定量PCR仪中, 开始反应。