



## GENESEED® circRNA qRT-PCR Kit

### 产品概要

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。

### 产品组成

组分	Cat.No.GS0202 (50 rxns RT)
TransScript RT Enzyme (M-MLV)	100 $\mu$ L
Reverse Transcription Primer	100 $\mu$ L
5 $\times$ RT Buffer	200 $\mu$ L
RNase free H <sub>2</sub> O	1 mL

### 储藏与保质期

本产品应置于 -25 ~ -18°C，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。

### 操作方法

#### 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 $\times$ RT Buffer	4 $\mu$ L
TransScript RT Enzyme (M-MLV)	2 $\mu$ L
Reverse Transcription Primer	2 $\mu$ L
Total RNA	10 pg ~ 1 $\mu$ g
RNase free H <sub>2</sub> O	to 20 $\mu$ L

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 $-25 \sim -18^{\circ}\text{C}$ 保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。cDNA 应避免反复冻融。

## 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 $72^{\circ}\text{C}$ 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

- 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。
- 定量 PCR 仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。
- 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. 本产品是否可以在 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 储存

- 不可以。 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 储存将会导致产品活性下降。
- 该产品 $-25 \sim -18^{\circ}\text{C}$ 储存可以长期保持活性，推荐于 $-25 \sim -18^{\circ}\text{C}$ 储存。
- 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，推荐小体积分装后于 $-25 \sim -18^{\circ}\text{C}$ 储存。