



ExoCt™ RT-qPCR System User Manual

——用于定量检测外泌体中基因的表达

ExoCt™ First-Strand cDNA Synthesis Kit

Cat. No: QP125 (20 reactions)

Cat. No: QP126 (60 reactions)

ExoCt™ SYBR® Green RT-qPCR Kit

Cat. No: QP131 (20 RT and 200 qPCR reactions)

Cat. No: QP132 (60 RT and 600 qPCR reactions)

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
网址: www.genecopoeia.com (英文)
www.igenebio.com (中文)

© 2022 GeneCopoeia, Inc.

ExoCt™ RT-qPCR System

- I. 产品描述
- II. 产品组分及存储
- III. 实验前准备
- IV. 实验过程
- V. 使用许可与质量保证

I. 产品描述

ExoCt™ RT-qPCR System 是一种无需提取外泌体 RNA 即可直接对外泌体进行不同基因表达水平的定量检测体系。ExoCt™ First-Strand cDNA Synthesis Kit 由 ExoCt™ RT-for-All™ Buffer 和 ExoCt™ PAP/RTase Mix 组成, 可在同一反应管内对外泌体中的多种 RNA 模板(包括 miRNA, mRNA, LncRNA 等)同时进行逆转录反应。ExoCt™ SYBR® Green RT-qPCR Kit 包含逆转录试剂和 qPCR 试剂, 利用基于 SYBR® Green 的 qPCR 技术, 快速准确地定量检测外泌体 RNA。整个产品系列试剂盒包括 ExoCt™ First-Strand cDNA Synthesis Kit 和 ExoCt™ SYBR® Green RT-qPCR Kit。

II. 产品组分及存储

-20°C 储存至少 12 月, 避免反复冻融。

货号	产品	组成货号	组分	组分货号	规格
QP125	ExoCt™ First-Strand cDNA Synthesis Kit (20 reactions)	N/A	ExoCt™ Lysis Buffer	QP125-01	1×100 µl
		N/A	DNase I	QP125-02	1×10 µl
		N/A	5× ExoCt™ RT-for-All™ Buffer	QP125-03	1×80 µl
		N/A	20× ExoCt™ PAP/RTase Mix	QP125-04	1×20 µl
		N/A	ddH2O (RNase/DNase free)	QP006-07	1×1 ml
QP126	ExoCt™ First-Strand cDNA Synthesis Kit (60 reactions)	N/A	ExoCt™ Lysis Buffer	QP125-01	3×100 µl
		N/A	DNase I	QP125-02	3×10 µl
		N/A	5× ExoCt™ RT-for-All™ Buffer	QP125-03	3×80 µl
		N/A	20× ExoCt™ PAP/RTase Mix	QP125-04	3×20 µl
		N/A	ddH2O (RNase/DNase free)	QP006-07	3×1 ml
QP131	ExoCt™ SYBR® Green RT-qPCR Kit (20 RT and 200 qPCR reactions)	QP125	ExoCt™ Lysis Buffer	QP125-01	1×100 µl
			DNase I	QP125-02	1×10 µl
			5× ExoCt™ RT-for-All™ Buffer	QP125-03	1×80 µl
			20× ExoCt™ PAP/RTase Mix	QP125-04	1×20 µl
			ddH2O (RNase/DNase free)	QP006-07	1×1 ml
		QP031	5× BlazeTaq™ qPCR Mix	QP031-01	1×800 µl
			ROX Reference Dye	QP001-02	1×80 µl
		QP029	Universal Adaptor PCR Primer	QP029	1×20 µl

QP132	ExoCt™ SYBR® Green RT-qPCR Kit (60 RT and 600 qPCR reactions)	QP126	ExoCt™ Lysis Buffer	QP125-01	3×100 µl
			DNase I	QP125-02	3×10 µl
			5× ExoCt™ RT-for-All™ Buffer	QP125-03	3×80 µl
			20× ExoCt™ PAP/RTase Mix	QP125-04	3×20 µl
			ddH ₂ O (RNase/DNase free)	QP006-07	3×1 ml
		QP032	5× BlazeTaq™ qPCR Mix	QP031-01	3×800 µl
			ROX Reference Dye	QP001-02	3×80 µl
		QP029	Universal Adaptor PCR Primer	QP029	3×20 µl

III. 实验前准备

- 1) 尽可能使用不含核糖核酸酶的无菌一次性塑料容器。如果不能去除核糖核酸酶，使用前应进行灭菌。如果使用玻璃器皿，应在 160°C 下干热灭菌至少 2 小时，或在 37°C 下用 0.1% DEPC 水处理 12 小时，然后进行高压灭菌。
- 2) RNA 实验中建议使用专用的仪器设备，专用的仪器设备不能用于其他实验。
- 3) 尽量使用 0.1% DEPC 水配制试剂，使用前需灭菌。如果试剂不能灭菌，可用无菌容器和无菌水配制，使用前过滤。
- 4) 处理化学品时，建议穿戴实验服、一次性手套和护目镜。

样品准备

1. 从细胞培养基或其他液体中纯化外泌体。

注：推荐使用 GeneCopoeia 的 ExoSure™ Exosome Isolation Kit (Cat. No. EP002)。

2. 使用其他方法纯化的外泌体应在 1× PBS 中重悬。

注意：

- 1) 将试剂盒储存在 -20°C。避免将试剂储存在 4°C 或室温下。
- 2) 使用前，将试管轻轻翻转摇匀，充分混合试剂，避免出现气泡，然后短暂离心。
- 3) 所有反应配制的过程均需在冰上进行，使用 RNase free 的试剂和耗材，以减少 RNA 降解的风险。
- 4) 实验前请仔细阅读说明。

IV. 实验过程

外泌体裂解反应

1. 将 5 μ l 外泌体转移到新 PCR 管中，并加入 5 μ l ExoCt™ Lysis Buffer。
2. 加入 0.5 μ l DNase I。
注：若进行检测对象为 miRNA，DNase I 可以选择不加。
3. 充分混匀并短暂离心。
4. 在 PCR 仪器中设置，37°C 10 分钟，75°C 10 分钟，最后 4°C 保存。
5. 将含有裂解物的 PCR 管冰上放置。
6. 取 1-8 μ l 外泌体裂解物进行逆转录反应。

RT-For-All™ 逆转录反应

1. 按照下表用量在 PCR 板中加入每个反应所需的试剂组分

试剂	体积	终浓度
5× ExoCt™ RT-for-All™ Buffer	4 μ l	1×
20× ExoCt™ PAP/RTase Mix	1 μ l	1×
Exosome lysates	5 μ l (1-8 μ l)	-
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	to 20 μ l	-

2. 按照以下孵育条件进行逆转录反应：

温度	时间
37°C	30 min
85°C	5 min
4°C	hold

备注：逆转录反应产物可以在-80°C 存放六个月以上。

3. 将逆转录后的产物稀释 2-5 倍。取 2 μ l 进行 qPCR 反应。

注：RT-For-All™ 可同时对外泌体中的各种 RNA 进行逆转录，包括 miRNA、mRNA、LncRNA 等

qPCR 反应

1. 解冻并轻柔混匀试剂盒中的 5× BlazeTaq™ qPCR Mix。短暂离心使管中试剂集中于底部，冰上放置。根据定量 PCR 仪器需求，选择是否使用 ROX Reference Dye。
注：5× BlazeTaq™ qPCR Mix 可能出现黄色沉淀，不影响正常使用。解冻过程中轻柔振荡混匀，或者在 37°C 孵育 5~10 分钟，使沉淀完全溶解。
2. 按照下表内容，在 4°C（冰上）或者室温准备 qPCR 反应液。

Reagent	Volume	Final concentration
5× BlazeTaq™ qPCR Mix ^a	4 µl	1×
PCR forward primer (2 µM) ^b	2 µl	0.2 µM
PCR reverse primer (2 µM) ^c	2 µl	0.2 µM ^d
Template ^e		
ROX Reference Dye ^f (30 µM), optional	0.4 - 0.1 µl	600 -150 nM
Water (double distilled)		
■ Not Using ROX Reference Dye	10 µl	
■ Using ROX Reference Dye	9.6 - 9.9 µl	
Total	20 µl	

a. 使用 5× BlazeTaq qPCR Mix 一半的体积时，需要相应地减半其他组份的体积。如果总的 qPCR 反应体系发生变化，对应的反应体系中各试剂体积需要做相同比例的调整。

b. 引物是确保 qPCR 成功的重要因素，GeneCopia 提供经功能验证的人、小鼠或大鼠等多种属引物，即使在低拷贝数基因的情况下也能进行特异和灵敏的扩增。在设计自己的引物时，您可能希望使用 Oligo 引物分析软件(Molecular Biology Insights)或 primer Premier 软件(Premier Biosoft International)。

c. 试剂盒中包含的 Universal Adaptor PCR Primer 为 PCR 反向 primer，可用于 miRNA 的扩增。

d. qPCR 引物反应终浓度一般介于 0.2 ~0.6 µM 之间。通常 PCR 反应体系中引物的终浓度为 0.2 µM 时，可以获得比较好的实验结果。如果 qPCR 扩增效率比较低，可以适当地提高引物使用浓度，但是过高的引物浓度可能会降低 qPCR 扩增特异性。GeneCopia 提供的引物已经经过实验验证，可以获得特异性好、灵敏度高的扩增结果。

e. 将逆转录得到的 cDNA 稀释后作为模板使用。加入的 cDNA 溶液体积不能超过 qPCR 反应液总体积的 5%。

f. ROX Reference Dye 可用于校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。不同的定量 PCR 仪使用的 ROX Reference Dye 浓度不同，因此，根据不同的定量 PCR 仪器，选择使用不同浓度的 ROX Reference Dye。常见的定量 PCR 仪，使用 ROX Reference Dye 参考如下：

仪器	ROX 使用量 (20 µl 体系)	终浓度
Bio-Rad iCycler, MyiQ, iQ5, CFX-96, CFX-384, Eppendorf Mastercycler realplex, Roche LightCycler 480, LightCycler 2.0	None	No ROX
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT and 7900HTFast, ABI Step One, ABI Step One Plus	0.4 µl (0.2-0.4 µl)	600 nM (300-600 nM)
ABI 7500, 7500 Fast, ABI ViiA7, Stratagene Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	0.1 µl (0.02-0.1 µl)	150 nM (30-150 nM)

注：其他未列在上表中的定量 PCR 仪器类型，请根据仪器的使用说明书摸索合适的 ROX Reference Dye。

- 轻柔混匀 qPCR 预混液并短暂离心，按照反应体系说明将预混液加入 PCR 反应管或者反应板中。
- 短暂离心确保预混反应液充满 PCR 反应管底部。
- 根据下表设置二步法 qPCR 程序进行 qPCR 反应（以 ABI ViiA™7 定量 PCR 仪器推荐的反应程序为例）。

循环数	步骤	温度	时间	检测与否
1	预变性	95°C	30 sec	否
40	变性	95°C	10 sec	否
	退火和延伸	60°C	30 sec	是

*退火温度：一般设定为比引物 T_m 低 5°C。

注意事项

- 本试剂盒使用 SYBR Green 染料监测 qPCR 反应，因此可以在 qPCR 循环结束后立即进行熔解曲线分析，判定扩增产物的特异性。请参照不同的定量 PCR 仪器，选择合适的熔解曲线分析反应程序。以 ABI ViiA 7 定量 PCR 仪器推荐的反应程序为例。

步骤	温度范围	升温速率	恒定温度/持续时间	检测与否
1	72–95°C	2.05°C/sec	95°C/15 sec	否
2	95–60°C	-1.71°C/sec	60°C/60 sec	否
3	60–95°C	0.05°C/sec	95°C/15 sec	是

- 5×BlazeTaq qPCR Mix 中使用的 DNA 聚合酶是一种抗体修饰的热启动酶，95°C 预变性 30 秒即可充分激活。
- qPCR 扩增产物的 DNA 片段长度一般为 80~150bp 之间，个别情况下扩增产物的 DNA 片段长度达到 500 bp 也是可以接受的，请根据扩增产物的长度适当延长 72°C 延伸的时间。另外，部分仪器由于硬件或控制用的软件等特殊原因，延伸时间无法设定为 15 秒，此时请根据仪器的使用说明书，设定最适的可设定时间（如 Applied Biosystems 7000/7300 为 31 秒以上，7500 为 32 秒以上）。
- 以上的反应条件主要参考 ABI ViiA 7 定量 PCR 仪器进行设置，若使用其他的定量 PCR 仪，请参考对应的仪器使用说明书来设置具体的延伸时间及熔解曲线分析反应程序。

V. Limited Use License and Warranty

Limited Use License

The following terms and conditions apply to use of ExoCt™ RT-qPCR System (the Product). If the terms and conditions are not acceptable, the Product in its entirety must be returned to GeneCopoeia within 5 calendar days. A limited End-User license is granted to the purchaser of the Product. The Product shall be used by the purchaser for internal research purposes only. The Product is expressly not designed, intended, or warranted for use in humans or for therapeutic or diagnostic use. The Product must not be resold, repackaged or modified for resale, or used to manufacture commercial products without prior written consent from GeneCopoeia. This Product should be used in accordance with the NIH guidelines developed for recombinant DNA and genetic research. Use of any part of the Product constitutes acceptance of the above terms.

Limited Warranty

GeneCopoeia warrants that the Product meets the specifications described in the accompanying Product Datasheet. If it is proven to the satisfaction of GeneCopoeia that the Product fails to meet these specifications, GeneCopoeia will replace the Product. In the event a replacement cannot be provided, GeneCopoeia will provide the purchaser with a refund. This limited warranty shall not extend to anyone other than the original purchaser of the Product. Notice of nonconforming products must be made to GeneCopoeia within 30 days of receipt of the Product. GeneCopoeia's liability is expressly limited to replacement of Product or a refund limited to the actual purchase price. GeneCopoeia's liability does not extend to any damages arising from use or improper use of the Product, or losses associated with the use of additional materials or reagents. This limited warranty is the sole and exclusive warranty. GeneCopoeia does not provide any other warranties of any kind, expressed or implied, including the merchantability or fitness of the Product for a particular purpose.

GeneCopoeia is committed to providing our customers with high-quality products. If you should have any questions or concerns about any GeneCopoeia products, please contact us at 301-762-0888.

© 2022, GeneCopoeia, Inc.

GeneCopoeia, Inc.

9620 Medical Center Drive, #101, Rockville, MD 20850

Tel: 301-762-0888 Fax: 301-762-3888,

Email: inquiry@genecopoeia.com

Web: www.genecopoeia.com