

版本号: FP151203

Quant One Step RT-qPCR Kit (SYBR Green)

Quant一步法反转录-荧光定量试剂盒 (SYBR Green)

目录号: FP303

产品内容

产品组成	FP303-01 50 μ l \times 50 rxn
2 \times Quant One Step SYBR RT-qPCR Master Mix ^{*1}	1.3 ml
HotMaster Taq Polymerase (2.5 U/ μ l)	130 μ l
Quant RTase (for one step)	30 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	2 \times 1 ml

^{*1} 内含dNTP Mixture, Mg²⁺, SYBR Green I和ROX Reference Dye等。

储存条件

请将该试剂盒（含有ROX内参染料）置于-20 $^{\circ}$ C避光保存。

适用的Real Time PCR扩增仪

ABI PRISM 7000/7700/7900HT, 7300/7500 Real-Time PCR System, 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

OPTICON[™] / CFX96 (BIORAD)

Light Cycler480 (Roche)

Smart Cycler[®] System (Cepheid)

Mx3000 P/Mx3005P (Stratagene)

Line-Gene (Bioer, 杭州博日)

其他各种Real Time PCR扩增仪

产品简介

本制品是采用SYBR® Green I嵌合荧光法进行Real Time PCR的专用试剂。使用本制品进行Real Time RT-qPCR反应可在同一反应管内连续进行，操作简单，并能有效防止污染。本反应体系由于可以对扩增产物进行实时检测，大大提高了检测灵敏度，并省略了PCR反应后的电泳步骤，非常适合于微量RNA的检测。

本制品中使用了最适合于Real Time RT-qPCR的反转录酶Quant RTase和Hotmaster Taq DNA polymerase, Quant RTase是一种由工程菌进行重组表达的全新高效逆转录酶，具有与RNA高亲和性的特点，其能通读GC含量高、二级结构复杂的RNA模板，而Hotmaster Taq DNA Polymerase利用抑制剂通过温度调节方式封闭Hotmaster Taq DNA Polymerase的底物结合位点，温度低于40°C时，形成非活性的酶-抑制剂复合物，当温度升高至引物特异性的退火温度时，结合平衡向模板-特异性引物复合物形成方向移动，因此最大限度的减少PCR扩增全程中的非特异性扩增产物产生，大大提高了荧光定量PCR反应的精确性。

本制品可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。

产品特点

1. 一步完成Real Time RT-qPCR反应，快速、准确地对RNA病毒等微量RNA进行分析。
2. PCR使用了改良后的HotMaster Taq Polymerase，可以进行Hot Start法PCR反应，再与TIANGEN公司独自开发的Buffer系统相结合，具有高扩增效率，高扩增灵敏度，高扩增特异性之特点。
3. 2×Quant One Step SYBR RT-qPCR Master mix中预先混有SYBR® Green I和ROX Reference Dye等，无需花时间融解，反应液配制十分简单方便。

用户自备

1. 引物
 2. 模板
 3. 分子生物学实验级别的水（无核酸酶）
 4. 一次性手套
-

注意事项

- 1) 当同时需要进行数次Real Time One Step RT-qPCR反应时，应先配制各种试剂的混合液（Master Mix；其中包括RNase-Free ddH₂O、Buffer、各种酶等），然后再分装到每个反应管中。这样可使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失，避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作或实验样品之间产生的误差。
- 2) 使用HotMaster Taq Polymerase 和Quant RTase时，应轻轻混匀，避免起泡；分取之前要小心地离心收集到反应管底部；由于酶保存液中含有高浓度的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。
- 3) 保存2×Quant One Step SYBR RT-qPCR Master mix或配制Real Time One Step RT-qPCR反应液时应避免强光照射。
- 4) 反应液的配制、分装时请一定使用新的（无污染的）枪头或带滤芯枪头、Microtube等，尽量避免污染。
- 5) 制品只能使用特异性反转录引物，不能使用Random Primer和Oligo dT Primer等进行反转录反应。

操作步骤

- 1) 按下列组份配制RT-qPCR反应液（反应液配制请在冰上进行）。

组成成分	50 µl 体系	终浓度
2×Quant One Step SYBR RT-qPCR Master Mix	25 µl	1×
Hotmaster Taq Polymerase 2.5 U/µl	2.5 µl	
Quant RTase (for one step)	0.4 µl	
正向引物	-	0.20 µM ¹
反向引物	-	0.20 µM ¹
RNA 模板 ²	-	-ng-pg
RNase-Free ddH ₂ O	至50 µl	-

¹ 通常引物终浓度为0.20 µM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1-1.0 µM 范围内调整引物浓度。

² 建议在反应液中使用10 pg-100 ng的Total RNA为模板。

2) 进行Real Time One Step RT-qPCR反应

PCR反应管请用离心机瞬时离心后放入荧光定量PCR仪中进行Real Time PCR反应。建议采用下列图表显示的标准PCR反应程序，如果使用该程序得不到良好的实验结果时，再进行PCR条件的优化。

循环	步骤	温度	时间	内容
1×	1	50°C	30 min	反转录
1×	2	95°C	2 min	起始模板变性
35-45×	3	94°C	20 sec	PCR循环中模板变性
	4	50-60°C	20 sec	退火
	5	68°C	20 sec	延伸

3) 实验结果分析。

反应结束后确认Real Time One Step RT-qPCR的扩增曲线和熔解曲线，进行RT-PCR定量时制作标准曲线等。
