



HSYBR One Step RT-qPCR Kit

HSYBR 一步法荧光定量RT-qPCR 试剂盒

Cat. No. ZF301-1 200T

保存:-20°C避光保存一年。

组分说明:

Cat. No. ZF301-1	200T
2×HSYBR One Step RT-qPCR Buffer	2ml
QK SYBR Enzyme Mix	80μl
RNase-Free Water	2ml
Dye ROX (50×) 参见第二页说明	80μl (试剂盒中不配, 需要的客户可索要)

产品简介:

本产品是一步法Real-Time RT-qPCR 专用试剂盒。所含的SYBR Green I 荧光染料可以与所有的双链DNA 相结合, 使该产品可以用于多种不同靶序列的检测而不需合成特异性标记探针。使用本产品进行Real Time RT-qPCR 反应, 逆转录和定量PCR 在同一反应体系中进行, 反应过程中无需添加试剂, 无需打开管盖, 避免了污染的同时提高了实验效率。高效的QKRT酶高效逆转录的同时可完美的兼容DNA聚合酶, 实现高效地RT-qPCR。高效热启动酶, 在常温下酶的活性被封闭, 使得该酶在低温或常温下没有活性, 从而有效避免在常温条件下由引物和模板非特异性结合或引物二聚体而产生的非特异性扩增, 极大提高了荧光定量PCR 反应的精确性。使用本产品可以得到更广的线性范围, 对目的基因定量更准确。所含的Dye ROX 染料可校正定量PCR 仪孔与孔之间产生的荧光信号误差, 适用于以Dye ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪。

产品特点:

- 1、操作简单, 降低操作过程中的污染几率。
- 2、灵敏度高, 总RNA可以低到pg级; 即使电泳看不到明显的RNA, 依然扩增良好。
- 3、特异性高, 数据准确。

注意事项:

- 1、本试剂盒中的各试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀, 尽量避免起泡, 并经短暂离心后使用。
- 2、本产品以 RNA 为模板进行一步法RT-PCR 实验, 在操作过程中应避免RNase 污染, 建议在专门的区域进行RNA 操作, 使用专门的仪器和耗材, 操作人员戴口罩和一次性手套并经常更换手套。
- 3、HSYBR One Step RT-qPCR Buffer和Dye ROX中含有荧光染料, 保存本产品或配制PCR 反应液时应避免强光照射。
- 4、本试剂盒必须使用特异性引物, 不能使用Oligo (dT) 和Random Primer。引物设计的好坏直接影响到RT-qPCR 反应的结果, 设计引物时需考虑GC含量, 引物长度, 引物位置, PCR 产物的二级结构等因素, 建议采用专业的引物设计软件进行设计。
- 5、本品不能用于探针法荧光定量 PCR。



使用方法:

1. 将RNA模板、引物、2×HSYBR One Step RT-qPCR Buffer、QKEnzyme Mix和RNase-Free Water溶解并置于冰上备用。

2. PCR 反应体系：

试剂	20 μl反应体系	终浓度
2×HSYBR One Step RT-qPCR Buffer	10 μl	1×
Forward Primer, 10 μM	0.4 μl	0.2 μM
Reverse Primer, 10 μM	0.4 μl	0.2 μM
QK SYBR Enzyme Mix	0.4 μl	
Dye ROX(依据下面的说明添加)	0.4 μl	
RNA Template	X μl	1 pg - 1μg
RNase-Free Water	up to 20 μl	

注意：通常引物浓度以0.2 μM可以得到较好结果，可以终浓度0.1-0.5 μM作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。

Dye ROX适用机型

Dye ROX A (50×) ABI 7500, ABI 7500 fast, Corbett Rotor Gene3000, Stratagene Mx3000/Mx3005P (安捷伦)。

Dye ROX B (50×) ABI 7000/7300/7700/7900,Eppendorf, ABI Step one, ABI Step one plus, 博奥。

Roche、Bio-Rad、Takara TP800、Corbett Rotor Gene 6000、Corbett Rotor Gene G、博日等产家或机型，本身具有校正功能，无需添加Rox。对于可加可不加的，厂家的推荐一般是不加。

3. 涡旋震荡混匀，短暂离心，将溶液收集到管底。

4. 将热循环仪预热到45°C，将PCR管置于热循环仪中，按以下反应条件进行反应。

PCR反应条件：(目的片段大小300bp)

步骤	温度	时间	
反转录	45°C	5 min	
PCR预变性	94°C	1 min 1)	
变性	94°C	10 s	} 40-45 个循环
退火/延伸 2)	60°C	40 s	
融解曲线分析 3)			
	95°C	15 s	
	60°C	1 min	
	95°C	15 s	
	60°C	15 s	

注意：1) 建议采用两步法PCR反应程序，若因使用Tm值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法PCR扩增。

2) 退火温度请以 56°C-64°C的范围作为设定参考。一般来说高特异性选择两步法，高扩增效率选择三步法。

3) 融解曲线分析请以所使用的荧光定量PCR仪推荐的程序进行设定，本说明是以ABI 7500荧光定量PCR仪为参照设定。