



## 一步法荧光定量 PCR 试剂盒（染料法）

### One-Step qRT-PCR Kit (Green)

货号：C06-01020

规格：100 rxn /500 rxn /1000 rxn

保存条件：-20℃避光保存，有效期 24 个月。

#### 产品简介：

本产品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行一步法实时荧光定量检测的专用试剂盒。使用本产品进行 Real Time RT-PCR 反应时以提取的 RNA 为模版，在同一反应管内连续进行反转录和荧光定量检测，操作简单，并能有效防止污染。本产品基于高效的反转录酶、抗体型 Hot start Taq DNA 聚合酶配合优化的 Buffer 体系研制，在提高检测灵敏度的同时保证了扩增的特异性；非常适用于 RNA 病毒等微量目标基因的检测。

本产品具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点，使用时只需加入模板、引物、ROX Reference Dye（用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，根据不同荧光定量 PCR 仪选择使用）和水，使其工作浓度为 1×，即可进行反应，可减少人为误差、节约 PCR 实验操作时间、降低污染几率。

#### 产品组分：

组分名称	100 rxn	500 rxn	1000 rxn
One-Step Enzyme Mix	200 µl	1 ml	1 ml x 2
2× Green One-Step qRT-PCR Buffer	1 ml	1 ml x 5	5 ml x 2
DEPC-ddH <sub>2</sub> O	1 ml	1.5 ml x 3	5 ml x 2
ROX Reference Dye	40 µl	200 µl	400 µl
ROX Reference Dye II	40 µl	200 µl	400 µl

\*注：不同仪器所需 ROX Reference Dye 不同：

需加 ROX Reference Dye (50×) 的机型:ABI Prism7000/7300/7700/7900HT 和 ABI Step One /ABI Step One Plus。

需加 ROX Reference Dye II (50×) 的机型:ABI Prism7500/7500 Fast, MJ Research Chromo4, Opticon (II) , Corbett Rotor Gene 3000。

无需加 ROX Reference Dye 的机型: Thermal Cycler Dice Real Time System , LightCycler , Smart Cycler System, Corbett Rotor-gene 6000, Agilent Technologies Mx3000P 等荧光定量 PCR 仪。

#### 使用注意：

1. 实验过程中请注意避免 RNase 污染。
2. 除酶以外的各种试剂，使用之前请完全溶解并充分混匀，以防因盐离子浓度不均影响实验结果。
3. RNA 模板的完整性对 cDNA 合成效率起着决定性作用，因此请选择可靠的 RNA 提取/纯化方法。
4. 如果扩增片段较长或者 RNA 结构复杂，可以将 RNA 单独置于 65℃加热 5-10 min 后再加入体系提高

反转录效率。

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。
6. 当同时需要进行数次 One Step qRT-PCR 反应时，应先配制各种试剂的混合液，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。
7. 使用 One Step Enzyme Mix 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 50%的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。-20℃保存，使用后立即放回冰箱。

#### 操作示例：

##### 1、按下表配制 PCR 反应体系：

组分名称	体积	终浓度
RNA 模板*	1-2 $\mu$ l	10 pg-100 ng
上游引物 GSP (10 $\mu$ M) **	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
下游引物 GSP (10 $\mu$ M) **	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
2 $\times$ Green One Step qRT-PCR Buffer	10 $\mu$ l	1 $\times$
One Step Enzyme Mix	2 $\mu$ l	-
ROX Reference Dye/ROX Reference Dye II***	0.4 $\mu$ l	1 $\times$
DEPC-ddH <sub>2</sub> O	补至 20 $\mu$ l	

\*：以 HeLa 细胞 Total RNA 模板为例，20  $\mu$ l 反应体系中加入 Total RNA 的量为 10 pg-100 ng 为宜。建议将 RNA 样品稀释 5-10 倍后，取 2  $\mu$ l 加入 PCR 反应体系，以确保更小的移液误差。

\*\*：引物的终浓度可在 0.1  $\mu$ M-1  $\mu$ M 之间调整。

\*\*\*：请根据 real-time PCR 机器的型号，选择对应的 ROX Reference Dye。

##### 2、进行荧光定量 PCR 反应

两步法流程	温度	时间	
反转录*	50℃	5-15min	
预变性	94℃	2min	
变性	94℃	15 sec	} 35-45 个循环
退火-延伸	60℃	15-30 sec	
熔解曲线		机器预设	

三步法流程**	温度	时间	
反转录*	50℃	5-15min	
预变性	94℃	2min	
变性	94℃	15 sec	} 35-45 个循环
退火	60℃	15 sec	
退火-延伸	72℃	30 sec	
熔解曲线		机器预设	

\*：通常 PCR 产物长度在 80-200 bp，此时采用 5 min 的反转录时间即可。

\*\*：当两步法扩增效率不好的时候建议选择三步法进行 qPCR 反应。

##### 3、在适当的qPCR仪器上完成实验，并分析结果。