

一步法 RT-qPCR 试剂盒 (SYBR 法) 说明书

产品概述

本品使用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行一步法 RT-qPCR，反转录和 qPCR 反应在同一管内完成，操作简单、快捷，可有效降低污染风险。通过整合延伸能力较强的反转录酶、性能优越的热启动酶以及优化的反应体系，适用性广，可用于各种模板的扩增，在短时间内即可高效合成 cDNA 并高效稳定地进行 qPCR 扩增。

产品组成

试剂盒组成	FZ005-100	FZ005-250
One Step RT-qPCR Buffer(SYBR) ^{*1}	1mL*1	1.25mL*2
One Step Enzyme Mix	80μL*1	200μL*1
ROX Reference Dye (4 μM) ^{*1}	40μL*1	100μL*1
ROX Reference Dye (20 μM) ^{*1}	40μL*1	100μL*1
RNase free water	1mL*1	1mL*3

*1: 该溶液中含有荧光染料，请避光保存。

储存及运输条件

冰袋运输。试剂置于-20℃保存，有效期 18 个月。

操作方法

(以 ABI QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR Systems 为例)

1. 配制 RT-qPCR 反应液

组分名称	20μL 体系
One Step RT-qPCR Buffer (SYBR)	10 μL
One Step Enzyme Mix	0.8 μL
Primer F (10μM) ^{*1}	1 μL
Primer R (10μM) ^{*1}	1 μL
ROX Reference Dye (4 μM) ^{*2}	0.4 μL
Template ^{*3}	≤ 100 ng
RNase free water	up to 20 μL

*1: 引物推荐使用终浓度为 0.5 μM，也可以根据需要在 0.2 ~ 1.0 μM 范围内调整。

*2: 若需要使用 ROX 进行荧光信号校准，请按照仪器推荐量添加；若不需要，可使用 RNase free water 代替 ROX Reference Dye 加入反应体系中。

*3: 20 μL 体系内 RNA 模板添加量通常不高于 100 ng；必要时可梯度稀释，以确定合适的模板添加量。

2. 设置 RT-qPCR 反应程序^{*1}

推荐选择两步法扩增程序，具体如下表所示：

RT-qPCR 反应程序 (两步法)			
步骤	温度	时间	循环数
1	42℃	5 min ^{*2}	1
2	95℃	10 sec ^{*3}	1
3	95℃	5 sec	40
	60℃	30 sec ^{*4}	
4	熔解曲线		

*1: 请参照仪器操作手册设置反应条件。

*2: 通常 42℃、反应时间 5 min 可以得到较好的结果，如扩增结果不好，可尝试调整反转录温度至 50℃，也可



延长反转录时间，以得到理想的实验结果。

*3: 预变性时间通常设定为 10 sec, 如果模板变性困难, 可延长预变性时间至 1~2 min。

*4: PCR 扩增产物建议设计在 80~150 bp, 可延长至 300 bp, 扩增延伸反应条件设定为 60°C、30 sec 时通常情况下可以满足要求; 如需提高反应特异性, 可适当提高退火温度。

3. 结果分析

反应结束后, 确认熔解曲线及扩增曲线, 进行数据分析。

📌 注意事项

1. 为防止 RNase 污染, 请保持实验区域洁净, 实验过程中应佩戴一次性的口罩、手套。实验所用的耗材, 如枪头、PCR 管等耗材均需 RNase free 级别。
2. 试剂盒内各组分使用前应充分融化并混匀瞬离后备用。
3. One Step Enzyme Mix 甘油浓度较高, 使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部, 减少损失, 并用移液枪轻柔吸打混匀 (避免起泡), 再进行使用。
4. One Step RT-qPCR Buffer (SYBR) 内含有 SYBR Green I 染料, 因此操作过程中要注意避免强光照射; 融化过程中如有不溶物请充分混匀至沉淀全部消失。
5. 同时进行数次反应时, 可先配制各种试剂的混合液, 然后分装到每个反应管中。
6. 使用本产品进行反转录反应时必须使用特异性引物, 不能使用随机 Primer、Oligo dT Primer。
7. 如需提高扩增效率, 或者 PCR 扩增产物较长, 则可将反应延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。具体程序如下表所示:

RT-qPCR 反应程序 (三步法)			
步骤	温度	时间	循环数
1	42°C	5 min	1
2	95°C	10 sec	1
3	95°C	5 sec	40
	55°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
4	熔解曲线		

8. 实验需要高纯度及完整的模板。若模板降解或含有抑制 RT-qPCR 反应的物质, 会导致扩增结果 Ct 值较大, 扩增效率较低。需重新制备、提纯模板, 重复实验。
9. 根据下表为仪器选择合适的 ROX:

无需添加 ROX Reference Dye 的 qPCR 仪	(Bio-Rad) IQ5, CFX96, CFX384, CFX Connect, MJOpticon, Opticon2; (Cepheid) SmartCycler System, Smart Cycler II System; (Roche) LightCycler 2.0, 480, 96; (Qiagen) Rotor-Gene Q, 3000, 6000; (Bioer) Line-Gene; (Eppendorf) Mastercycler ep realplex; (AnalytikJena) qTOWER3; (TaKaRa) Thermal Cycler Dice™TP700, TP760, TP900, TP960, TP950, TP970, TP980, TP990
需要添加 ROX Reference Dye (20µM) 的 qPCR 仪	(Thermo) ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus
需要添加 ROX Reference Dye (4µM) 的 qPCR 仪	(Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio™3 / 5, QuantStudio™6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™Dx; (Agilent) Mx3000P™, Mx3005P™, MX4000™

