

Biomarker One Step SYBR Green RT-qPCR Kit

目录号: RK02012

规格: 250 RXN (20 μ L/RXN)



◆ 产品介绍

Biomarker One Step SYBR Green RT-qPCR Kit (一步法RT-qPCR试剂盒) 采用SYBR Green I 嵌合荧光法, 以RNA为模板进行定量PCR反应。在实验过程中, 逆转录和PCR反应在一管内进行, 不需要额外的开管/移液操作, 简化了操作流程, 降低了样本交叉污染的风险。

本试剂盒以RNA为模板, 使用基因特异性引物, 在BiomarkerScript II One Step Enzyme Mix作用下, 高效合成第一链cDNA。再以cDNA为模板, 在2×One Step SYBR Green RT-qPCR Buffer作用下, 配合优化的缓冲体系(缓冲体系中添加了有效抑制非特异性PCR扩增的组分和提高扩增能力的促进因子), 对高/低丰度的目的基因进行

精准定量扩增, 该试剂盒重复性好, 可信度高。

◆ 产品组成

试剂盒组成	目录号	250 RXN (20 μ L/RXN)
2×One Step SYBR Green RT-qPCR Buffer ^a	RM02113	1.25 mL × 2
BiomarkerScript II One Step Enzyme Mix ^b	RM02114	200 μ L
50× ROX Reference Dye I	RM02101	100 μ L
50× ROX Reference Dye II	RM02104	100 μ L
RNase-free ddH ₂ O	RM02110	1.25 mL × 2

a. 包含dNTPs Mix、Mg²⁺ 特异性增强剂、SYBR Green I。

b. 包含BiomarkerScript II Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor和Taq DNA Polymerase。

◆ 适用机型

试剂盒中的ROX I和ROX II, 可用于校正孔与孔之间产生的荧光信号误差, 不同仪器所需ROX Reference Dye浓度不同, 参考如下:

ROX类型	qPCR仪器
无需ROX参比染料	Bio-Rad iCycler系列、Roche Light Cycler系列、Qiagen/Corbett 系列、Eppendorf系列等
50×ROX Reference Dye I (High Rox)	ABI 7000/7300/7700/7900、ABI StepOne/StepOnePlus等
50×ROX Reference Dye II (Low Rox)	ABI 7500、ABI ViiATM7、ABI Quanta-Studio系列、Stratagene系列、Corbett Rotor Gene 3000等

◆ 运输与保存条件

运输方式: 低温运输。

保存方式: -20 °C避光保存, 本产品避免反复冻融。

◆ 注意事项

1. 试剂盒中的BiomarkerScript II One Step Enzyme Mix含有高浓度甘油, 使用前请短暂离心, 并用移液枪轻轻吹打, 充分混匀后准确吸取。
2. 使用2×One Step SYBR Green RT-qPCR Buffer时, 避免强光照射, 并注意避光保存。
3. 实验过程中请使用RNase-free的枪头和EP管, 尽量避免RNase污染。
4. 为保证反应的成功, 建议使用高质量的RNA模板。

◆ 自备试剂&耗材

试剂: PCR引物、RNA模板。

耗材: 荧光定量PCR专用管或平板、1.5 mL RNase-free EP管、移液器和枪头。

◆ 实验流程

1. 配制 One Step RT-qPCR反应体系。(建议冰上配置反应体系)

组分	加入量 ^a (20 μL体系)	加入量 ^a (50 μL体系)
2×One Step SYBR Green RT-qPCR Buffer	10 μL	25 μL
BiomarkerScript II One Step Enzyme Mix	0.8 μL	2 μL
正向引物(10 μM) ^b	0.4 μL	1 μL
反向引物(10 μM) ^b	0.4 μL	1 μL
ROX I / II (如需添加, 根据机型选择) ^c	0.4 μL	1 μL
Total RNA ^d	≤1 μg (100 pg及以上效果更佳)	
RNase-free ddH ₂ O	to 20 μL	to 50 μL

a. 选择20 μL还是50 μL的反应体系, 需要客户根据自己的需求来定。

b. **引物种类:** 该实验只能使用基因特异性引物, 不能使用随机引物或Oligo dT引物等进行反应。

引物浓度: 引物终浓度一般为0.2 μM时, 可以得到较好的结果。反应性能较差时, 可以在0.1-1.0 μM范围内调整引物浓度。

产物大小: 扩增产物的长度建议选择在70-200 bp范围内。

c. 根据适用机型选择合适的ROX Reference Dye。

d. 建议在20/50 μL体系中加入10 pg~1 μg的Total RNA模板, 推荐100 pg及以上效果更好。

2. One Step RT-qPCR反应程序

序号	步骤	温度	时间	循环数(Cycles)
1	逆转录	42 °C	5 min	1
2	预变性	95 °C	1 min	1
3	循环反应	95 °C	5 s	40
		60 °C	30-34 s ^a	
4	融解曲线	仪器自动设置 ^b		

a. 延伸时间: 根据qPCR仪所需数据采集时间自行调整延伸时间:

使用ABI 7700/7900和StepOnePlus仪器, 采集时间设定为30s;

使用ABI 7300仪器, 采集时间设定为31s;

使用ABI 7500仪器, 采集时间设定为34s。

荧光信号采集: 在60 °C延伸阶段。

b. 融解曲线: 仪器类型不同, 融解曲线采集程序不尽相同, 使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

3. 实验结果分析

反应结束后确认One Step RT-qPCR的扩增曲线、融解曲线、Ct值、标准曲线等, 并进行定量结果分析。一般qPCR反应有效性标准如下:

◆ qPCR反应有效性确认标准

1. 线性关系及扩增效率确认	
标准曲线相关系数(R ²)	>0.98
标准曲线斜率(K)	-3~-3.5
PCR扩增效率(E)	0.9~1.2
2. 重复性确认	
STD值	<0.2
3. 特异性确认	
扩增产物融解曲线无明显非特异性扩增产物或引物二聚体杂峰(必要时请进行琼脂糖电泳确认)	