

UltraSYBR One Step RT-qPCR Kit UltraSYBR一步法荧光定量PCR试剂盒

项目号: U665751

保存条件: -20℃避光, 如需频繁使用, 可存放于 2-8℃, 尽量避免反复冻融。

产品内容

Component	U665751-100T
2×UltraSYBR One Step Buffer	1.4ml
UltraSYBR One Step EnzymeMix	50 μl
50×High ROX	50 μl
RNase-Free Water	1.5ml

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。全新高效逆转录酶 RNase H 活性缺失, 减少了逆转录反应中 RNA 的降解。该酶逆转录效率高, 可对少量 RNA 模板进行良好的逆转录反应。与 RNA 亲合性高, 能通读 GC 含量高, 二级结构复杂的 RNA 模板。全新高效热启动酶, 在常温下酶的活性被封闭, 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。所包含的缓冲系统使以上两种酶同时发挥最大功效, 提高效率。本产品灵敏度高, 特异性高, 线性范围广, 对目的基因定量更准确。

ROX 染料用于校正定量 PCR 仪孔与孔之间产生的荧光信号误差, 一般用 ABI、Stratagene 等公司的 Real Time PCR 扩增仪。不同仪器的激发光学系统有所不同, 因此 ROX 染料的浓度必须与相应的荧光定量 PCR 仪相匹配。

不需要 ROX 校正的仪器:

Roche LightCycler 480, Roche LightCycler 96, Bio-rad iCycler iQ, iQ5, CFX96 等。

需要 Low ROX 校正的仪器:

ABI Prism7500/7500 Fast, QuantStudio®3 System, QuantStudio®5 System, QuantStudio®6 Flex System, QuantStudio®7 Flex System, ViiA7 system, Stratagene Mx3000/Mx3005P, Corbett Rotor Gene 3000 等。

需要 High ROX 校正的仪器:

ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One/Step One Plus 等。

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, 实验相关耗材应用 0.1%DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液在 37℃处理 12 小时, 并高压灭菌 30 分钟后使用。
3. UltraSYBR One Step RT-qPCR Buffer 中含有 SYBR Green I 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. 本试剂盒中的各试剂应避免反复冻融, 反复冻融可能使产品性能下降。本产品长期保存可置于-20℃, 避光。如果在短期内需要频繁使用, 可在 2-8℃保存。
5. 本试剂盒必须使用特异性引物, 引物的选择可根据具体实验来选择, 引物设计的好坏直接影响到 RT-PCR 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。
6. 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×UltraSYBR One Step Buffer、UltraSYBR One Step EnzymeMix 和 RNase-Free Water 溶解并置于冰上备用。

2. PCR 反应体系:

试剂	25 μ l 反应体系	终浓度
2×UltraSYBR One Step Buffer	12.5 μ l	1×
Forward Primer, 10 μ M	0.5 μ l	0.2 μ M ¹⁾
Reverse Primer, 10 μ M	0.5 μ l	0.2 μ M ¹⁾
UltraSYBR One Step EnzymeMix	0.5 μ l	
RNA Template	X μ l	10pg - 100ng
50×Low ROX or High ROX (optional) ²⁾	0.5 μ l	1×
RNase-Free Water	up to 25 μ l	

注意: 1) 通常引物浓度以 0.2 μ M 可以得到较好结果, 可以终浓度 0.1-0.5 μ M 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。

2) 不同仪器的激发光学系统有所不同, 根据使用荧光定量的仪器选择加入 50×Low ROX or 50×High ROX。

3. 涡旋震荡混匀, 短暂离心, 将溶液收集到管底。

4. RT-qPCR 反应条件(荧光定量 PCR 为两步法), 本程序是以 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为例。

步骤	温度	时间
反转录	45℃	10min
PCR预变性	95℃	5min
变性	95℃	10s
退火/延伸 ¹⁾	60℃	45s
} 30-40个循环		
融解曲线分析 ²⁾		
	95℃	15s
	60℃	1min
	95℃	15s
	60℃	15s

注意: 1) 建议采用两步法 PCR 反应程序, 若提高反应特异性, 可提高退火温度, 以 60-64°C 作为设定范围的参考; 若因使用 T_m 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) 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, 本程序是以 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为参照设定。

RT-qPCR 反应条件(荧光定量 PCR 为三步法):

步骤	温度	时间
反转录	45℃	10min
PCR预变性	95℃	5min
变性	95℃	15s
退火 ¹⁾	56℃-64℃	30s
延伸		30s
		30s
} 35-40个循环		
融解曲线分析 ²⁾		
	95℃	15s
	60℃	1min
	95℃	15s
	60℃	15s

注意：1) 三步法 PCR 扩增时，退火温度请以 56℃-64℃ 的范围作为设定参考。
2) 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，本程序是 ABI 750 荧光定量 PCR 仪为参照设定。