

# Evo M-MLV一步法RT-qPCR试剂盒 (SYBR法) Ver.2

## Evo M-MLV One Step RT-qPCR Kit (SYBR) Ver.2

Code No. AG11732

<b>包装量:</b>	250 rxns / 20 $\mu$ l
<b>保存温度:</b>	-20 $^{\circ}$ C

### 产品概述

本产品是使用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 One Step RT-qPCR 专用的试剂盒，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。本产品使用了延伸能力较强的 *Evo M-MLV* 反转录酶，整合热启动 *Pro Taq HS* 的优越性能，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。

### 保存及运输

保存温度：-20 $^{\circ}$ C 保存

【2X One Step RT-qPCR Buffer II (SYBR) 请避光保存。】

运输温度：干冰运输或 -20 $^{\circ}$ C 冰袋运输。

### 产品组成

2X One Step RT-qPCR Buffer II (SYBR) <sup>*1</sup>	1.25 ml x 2 pcs
One Step Enzyme Mix II <sup>2</sup>	200 $\mu$ l
RNase free water	1 ml x 3 pcs

\*1: 该溶液中含有 dNTP Mixture、反应 Buffer 与 SYBR 染料，请避光保存。

\*2: 含有 *Evo M-MLV* RTase, RNase Inhibitor, *Pro Taq HS* DNA Polymerase。

### 注意事项

1. 所有反应混合液需要在冰上配制。需要同时进行数次反应时，应先配制各种试剂的混合液，然后分装到每个反应管中。
2. 2X One Step RT-qPCR Buffer II (SYBR) 含有 SYBR Green I，因此操作过程中要注意避免强光照；融化过程中如有不溶物请充分混匀至沉淀全部消失。
3. 使用本产品进行反转录反应时必须使用特异性引物，Random Primer、Oligo dT Primer 不能使用。

### 实验操作

(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems 为例)

组分名称	20 $\mu$ l 体系 <sup>*1</sup>	50 $\mu$ l 体系 <sup>*1</sup>
2X One Step RT-qPCR Buffer II (SYBR)	10 $\mu$ l	25 $\mu$ l
One Step Enzyme Mix II	0.8 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Primer F (10 $\mu$ M) <sup>2</sup>	0.8 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Primer R (10 $\mu$ M) <sup>2</sup>	0.8 $\mu$ l	2 $\mu$ l
ROX Reference Dye (4 $\mu$ M) <sup>3</sup>	0.4 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Template <sup>4</sup>	$\leq$ 100 ng	$\leq$ 250 ng
RNase free water	up to 20 $\mu$ l	up to 50 $\mu$ l

\*1: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。

\*2: 引物通常使用终浓度为 0.4  $\mu$ M，也可以在 0.2 ~ 1.0  $\mu$ M 范围内调整。

\*3: 如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准，请按照仪器推荐量添加；若不需要使用 ROX 的 PCR 仪，ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。

\*4: 在 20  $\mu$ l 体系里, RNA 模板添加量通常不高于 100 ng; 在 50  $\mu$ l 体系里, RNA 模板添加量通常不高于 250 ng。必要时可以进行梯度稀释, 以确定合适的模板添加量。

#### RT-qPCR 反应条件\*1 ( 两步法 PCR 反应程序 )

步骤	温度	时间	循环数
反转录	42°C <sup>*2</sup>	5 min <sup>*2</sup>	1
预变性	95°C	10 sec <sup>*3</sup>	1
变性	95°C	5 sec	} 40
退火和延伸	60°C	30 sec <sup>*4</sup>	
溶解曲线采集 <sup>*5</sup>	95°C	15 sec	} 1
	60°C	1 min	
	95°C	1 sec	

\*1: 请参照仪器操作手册设置反应条件。

\*2: 通常 42°C、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°C, 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, 可以延长预变性时间至 1 ~ 2 min。

\*4: PCR 扩增产物建议设计在 80 bp ~ 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; 如提高反应特异性, 可适当提高退火温度; 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 ( 三步法 PCR 反应程序可参考附录 1 ) 。

\*5: 此步为必须步骤, 此溶解曲线为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems Standard 模式下默认程序。不同仪器的溶解曲线采集程序不同, 选用仪器对应的默认程序即可。

详细信息请查阅 [www.agbio.com.cn](http://www.agbio.com.cn)

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

#### ➤ 结果检测

反应结束后, 确认扩增曲线, 并进行标准曲线分析。  
( 分析方法请参照仪器操作手册 )

#### ➤ 附录 1: RT-qPCR 反应条件 ( 三步法 PCR 反应程序 )

步骤	温度	时间	循环数
反转录	42°C	5 min	1
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	5 sec	} 40
退火	55°C	30 sec	
延伸	72°C	30 sec	} 1
溶解曲线采集	见两步法 PCR 溶解曲线采集程序		

#### ➤ 附录 2: 适合的部分定量 PCR 仪

##### ● 无需添加 ROX Reference Dye 的定量 PCR 仪:

(Bio-Rad) IQ5, CFX96™, CFX384™, CFX Connect™, MJOpticon, Opticon 2;  
(Roche) LightCycler® 2.0, 480, 96;  
(Analytik Jena) qTOWER3.

##### ● 需要添加 ROX Reference Dye (20 $\mu$ M) (AG11703) 的定量 PCR 仪:

(ROX Reference Dye 终浓度为 0.4  $\mu$  M)  
(Thermo) ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus.

##### ● 需要添加 ROX Reference Dye (4 $\mu$ M) (AG11710) 的定量 PCR 仪:

(ROX Reference Dye 终浓度为 0.08  $\mu$  M)  
(Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio™ 3 / 5, QuantStudio™ 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™ Dx.