

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

包装量:	250 rxns / 20 μ l
保存温度:	-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) ^{*1}	1.25 ml x 2 pcs
One Step Enzyme Mix II ^{*2}	200 μ 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. 防止 RNase 污染，请保持实验区域洁净，实验所用的离心管、枪头等耗材均需 RNase-free 级别。
2. One Step Enzyme Mix II 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。
3. 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。
4. 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射；融化过程中如有不溶物请充分混匀至沉淀全部消失。
5. 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 μ 体系 ^{*1}	50 μ 体系 ^{*1}
2X One Step RT-qPCR Buffer II (SYBR)	10 μ l	25 μ l
One Step Enzyme Mix II	0.8 μ l	2 μ l
Primer F (10 μ M) ^{*2}	0.8 μ l	2 μ l
Primer R (10 μ M) ^{*2}	0.8 μ l	2 μ l
ROX Reference Dye (4 μ M) ^{*3}	0.4 μ l	1 μ l
Template ^{*4}	\leq 100 ng	\leq 250 ng
RNase free water	up to 20 μ l	up to 50 μ 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 μM , 也可以在 0.2 ~ 1.0 μM 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 μl 体系里, RNA 模板添加量通常不高于 100 ng; 在 50 μl 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
Step 1	42°C*2	5 min*2	1
Step 2	95°C	10 sec*3	1
Step 3	95°C	5 sec	} 40
	60°C	30 sec*4	
Step 4	Dissociation stage		

- *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; 如需提高反应特异性, 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。

详细信息请查阅 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: 适合的定量 PCR 仪

● 无需添加 ROX Reference Dye 的定量 PCR 仪:

(Bio-Rad) IQ5, CFX96™, CFX384™, CFX Connect™, MJOpticon, Opticon 2;
(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;
(Analytik Jena) qTOWER3;
(TaKaRa) Thermal Cycler Dice™ TP700, TP760, TP900, TP960, TP950, TP970, TP980, TP990。

● 需要添加 ROX Reference Dye (20 μM) (AG11703) 的定量 PCR 仪:

(ROX Reference Dye 终浓度为 0.4 μM)
(Thermo) ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus。

● 需要添加 ROX Reference Dye (4 μM) (AG11710) 的定量 PCR 仪:

(ROX Reference Dye 终浓度为 0.08 μM)
(Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio™ 3 / 5,
QuantStudio™ 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™ Dx;
(Agilent) Mx3000P™, Mx3005P™, MX4000™。