

一步法RT-qPCR 2×SuperMix (SYBR Green) 目录号: AQ0401 使用前请仔细阅读说明书

Component	AQ0401A	AQ0401B	AQ0401C	AQ0401D
一步法RT-qPCR 2×SuperMix (SYBR Green)	1ml	1ml×5	5ml×4	5ml×10
50×Low ROX	40μl	200μl	800μl	1000μl×2
50×High ROX	40μl	200μl	800μl	1000μl×2
Nuclease free Water	1ml	5ml	5ml×4	5ml×10

## 产品说明:

本产品一步法RT-qPCR 2×SuperMix (SYBR Green)使用SYBR Green I 嵌合荧光试剂进行RNA分子的定量分析。本产品包含MMLV RTase2.0、RNase Inhibitor、热启动型Taq DNA聚合酶、dNTPs、SYBR Green和优化的反应缓冲液，浓度为2×。RT-qPCR 反应时，只需加入模板、引物和DEPC处理水，使2×SuperMix溶液的浓度为1×即可进行反应。RNA样本类型包括总RNA、mRNA、核糖体RNA、tRNA等。核心组分之一MMLV RTase2.0经基因工程改造，热稳定性显著提高，可以耐受55-60度，使得反转录反应可以在50-55度进行，从而消除了RNA二级结构对反转录的抑制作用。Buffer专门针对RT-qPCR进行了优化，MMLV RTase和Taq DNA聚合酶在该Buffer中均有较高活性，非常适合于一步法RT-qPCR。某些型号的qPCR仪需要ROX 参比染料。

## 特点:

- 一步法减少RT-qPCR操作时间。
- 避免因多步操作带来的污染。
- RNA片段的定量 (≤3 kb)。
- 热启动Taq酶，非特异性扩增导致的假阳性信号低，扩增效率高，稳定性好。
- MMLV RTase2.0可以在50-55度反转录，从而消除了RNA二级结构对反转录的抑制作用。

## 适用范围:

RNA样品 (mRNA、rRNA等)的RT-qPCR定量，染料为SYBR Green。

## 保存:

4度保存1个月；-20℃保存1年。

## 注意事项:

- 本品在4度避光保存1个月内稳定，尽量避免反复冻融，以免造成酶活下降。如每次使用量较少，推荐小份分装使用。
- 使用前请上下颠倒以混匀Master Mix，短暂低速离心后即可使用。请勿vortex避免酶失活，影响定量结果。
- 加样过程中轻柔吹打，如果操作不慎导致SuperMix起泡，需离心方可使用。
- 本品含有荧光染料SYBR Green I，需避光保存，配制反应体系时应尽量避免强光照射。
- 为了防止环境DNA的污染，反应体系配制时请于超净工作台内进行，配制过程中请使用灭菌枪头、反应管。
- 由于本品检测灵敏度极高，易被空气中气溶胶污染。因此如经常检测某些特定基因，为了避免气溶胶污染，建议使用本公司的UDG型SYBR Green 一步法RT-qPCR 2×SuperMix (AQ0411系列)

## 应用举例：一步法RT-qPCR (SYBR Green)

一步法 RT-PCR 将 RNA 反转录合成 cDNA、目标 cDNA 的 PCR 反应合二为一。以下反应举例为 50  $\mu$ l 标准一步法RT-PCR 体系，仅供参考。实际 RT-PCR 条件应根据模板、引物、目的片段大小加以优化，确定最佳反应条件。

### 1. 在无RNase A污染的PCR管中配制如下混合液

Component	Volume	Final Concentration
RT-qPCR 2 $\times$ SuperMix (SYBR Green)	25 $\mu$ l	1 $\times$
Forward Primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M
RNA Template*	Variable	as required
dd H <sub>2</sub> O	Variable	-
Total volume	50 $\mu$ l	-

\* Total RNA 的使用量一般为 10 ng~1  $\mu$ g；mRNA 的使用量一般为 1ng~1  $\mu$ g

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

- 有些q-PCR仪需要加入参比染料ROX进行校正，参比染料使用请咨询仪器生产商。
- 一般来说反应体系中引物终浓度为0.2  $\mu$ M即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度0.1 - 1.0  $\mu$ M范围内调整引物浓度。

### 2. 按下列条件进行qPCR反应

#### (1) 常规扩增条件

50 $^{\circ}$ C	30min	反转录
95 $^{\circ}$ C	1 min	预变性
95 $^{\circ}$ C	5-10 sec	循环扩增 30-40 Cycles
50~60 $^{\circ}$ C	15 sec	
72 $^{\circ}$ C	15 sec	
72 $^{\circ}$ C	1 min	

#### (2) 退火延伸一步法扩增条件

50 $^{\circ}$ C	30min	反转录
95 $^{\circ}$ C	1 min	预变性
95 $^{\circ}$ C	5-10 sec	循环扩增 30-40 Cycles
60-68 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	1min	

#### 注意事项

- 本反转录反应条件适合绝大多数RNA，如RNA模板结构复杂，可将反转录温度提高到55度，以提高反转录效果。
- PCR阶段常规变性时间选择10 sec；快速变性时间最短可选5 sec。
- 常规扩增条件的退火温度可以根据引物的T<sub>m</sub>值进行调整，当T<sub>m</sub>较高时可以提高退火温度，增加扩增条带的特异性。
- (1) 常规扩增条件下，200-300 bp片段延伸时间72度15 sec，200 bp以内片段72度10 sec；(2) 退火延伸一步法扩增条件下，200-300 bp片段延伸时间60度30 sec；200 bp以内片段延伸时间60度20 sec。
- 退火延伸一步法扩增条件下的引物T<sub>m</sub>值需要高于延伸温度3-5度。
- 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。