

试剂盒内容:

试剂盒组成	FP302-01 (50 次)	FP302-02 (200 次)
A. 反转录试剂		
Quant reverse Transcriptase	25 μ l	2 \times 50 μ l
oligo (dT) ₁₅ (10 μ M)	60 μ l	240 μ l
Random (10 μ M)	60 μ l	240 μ l
10 \times RT mix	50 μ l	2 \times 100 μ l
RNase-free ddH ₂ O	1ml	2 ml
dNTP(2.5 mM each)	60 μ l	240 μ l
B. qPCR 反应试剂		
RealMasterMix (2.5 \times , 含有 ROX 内参染料)	1.0 ml	4 \times 1.0 ml
20 \times SYBR solution	150 μ l	600 μ l

储存条件:

RealMasterMix (含有 ROX 内参染料) 和 20 \times SYBR solution 该试剂盒在 4 $^{\circ}$ C 可储存 3 个月; 若要长时间储存, 请将 RealMasterMix (含有 ROX 内参染料) 置于 -20 $^{\circ}$ C 避光保存。20 \times SYBR solution 对光敏感, 请避光保存。将 20 \times SYBR solution 加入至 2.5 \times RealMasterMix 后, 可在 -20 $^{\circ}$ C 储存 3 个月以上。如果 RealMasterMix 解冻后没有使用, 必须彻底混合均匀后才能重新冷冻; 因为在解冻过程中盐会出现

浓缩国际权威精华,
铸就 TIANGEN 优秀品质!

TIANGEN 为您提供国际化标准的生物学产品和服务:

- PCR、RT-PCR 系列
- 核酸 DNA、RNA 分离纯化系列
- DNA 分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品

Quant qRT-PCR (SYBR Green I) Kit

(目录号: FP302)

天根生化科技（北京）有限公司

TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD.

Order: 010-59822688

Technical: 010-59822661 59822665

Toll-free: 800-990-6057

<http://www.tiangen.com>

WWW.TIANGEN.COM

三 PCR 检测:

Hotmaster Taq DNA 聚合酶与其他热启动 Taq 酶不同之处是不需要热激活处理,缩短了整个 PCR 所需时间。对于大多数模板,起始的解链过程只需 94-95°C 1-2 分钟。如果模板的 GC 含量很高,则起始解链过程时间需延长至 10-15 分钟,为得到最佳结果,对不同的模板可采用梯度 PCR 优化反应条件。

注意: Hotmaster Taq DNA 聚合酶的延伸温度范围是 60-70°C,最佳延伸温度为 68°C。

三步法 PCR:

循环	步骤	温度	时间	内容
1×	1	94-95°C	1-2 分钟*	起始模板变性
35-45×	2	94-95°C	10-20 秒	PCR 循环中模板变性
	3	50-60°C	10-30 秒	退火
	4	68°C	10-60 秒	延伸

两步法 PCR:

循环	步骤	温度	时间	内容
1×	1	94-95°C	1-2 分钟*	起始模板变性
35-45×	2	94-95°C	10-20 秒	PCR 循环中模板变性
	3	60°C	20-60 秒	退火/延伸

* 解链时间的长短与模板的长度和 GC 含量有关

产品简介:

本试剂盒是以 RNA 为模板,使用 SYBR Green 法进行 Real Time RT-PCR 的专用试剂,由 A.反转录试剂 (Tiangen code: KR103) 和 B.qPCR 反应试剂 (Tiangen code: FP202) 两部分组成。其中, A.反转录试剂中使用的逆转录酶 Quant Reverse Transcriptase 是一种使用大肠杆菌工程菌进行重组表达的全新高效逆转录酶。该酶能够高效转录多种 RNA 模板,最大限度将 RNA 转录成 cDNA 第一链。

B.qPCR 反应试剂已经将 DNA 聚合酶、buffer、dNTP 等试剂预混在一起,进行实验时,PCR 反应液的配制十分简单方便。B.qPCR 反应试剂中提供了一种独特的 Hot-start 酶 (已获得专利),我们命名为 Hotmaster Taq DNA 聚合酶,该酶与 Tiangen 精心研制的 Real Time PCR 用 buffer 组合试用,可以最大限度的减少 PCR 扩增全程中的非特异性扩增产物产生,大大提高荧光定量 PCR 反应的扩增效率和精确性。

另外, B.qPCR 反应试剂中特别添加了 ROX 内参染料,用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

注意事项: 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 用于 cDNA 合成反应的溶液试剂尽可能用 DEPC 进行处理,并在高压灭菌后使用。有些试剂不能高压灭菌时,首先用经过灭菌的器具、水等配制溶液后,再将溶液进行过滤除菌处理。
2. RNA 样品要避免基因组 DNA 污染。
3. 避免多次反复冻融 RNA。
4. 试剂盒的各组成成分应在-20°C 保存。
5. cDNA 产物应置于-20°C 保存。

操作步骤 A:

下列操作步骤适用于模板量为 50ng-2 μ g 的总 RNA，如果总 RNA 量大于 2 μ g，请按比例扩大反应体系。

- 1 将模板 RNA 在冰上解冻；引物、10 \times RT mix（其中包含 RNasin 和 DTT）、dNTP 混合液、RNase-free ddH₂O 在室温（15-25 $^{\circ}$ C）解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。
- 2 按照表 1 的逆转录体系配制混合液，彻底混匀，涡旋振荡时间不超过 5 秒钟。简短离心，并置于冰上，RNA 模板请于第 4 步加入。
注意：如果下游进行荧光定量 PCR 实验，建议使用 10 μ l 逆转录反应体系，各反应组分相应减半。从而可以与 RealMasterMix（SYBR Green）反应次数匹配(FP202-01, 50 次 \times 50 μ l；FP202-02, 200 次 \times 50 μ l)。
- 3 如果要做多个逆转录反应，可以将配制好的混合液后分装在单个反应管中，置于冰上。
- 4 将模板 RNA（50ng-2 μ g）加入到混合液中，彻底混匀，涡旋振荡时间不超过 5 秒钟，简短离心以收集管壁残留的液体。
- 5 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟。
- 6 将逆转录的产物进行后续**荧光定量** PCR 反应。

表 1 逆转录反应体系

内容	体积	终浓度
10 \times RT mix	1 μ l	1 \times
dNTP 混合液（2.5mM each）	1 μ l	0.25mM each dNTP
Oligo-dT ₁₅ 或 Random（10 μ M）*	1 μ l	1 μ M
Quant Reverse Transcriptase	0.5 μ l	（10 μ l 反应体系）
RNase-free 水	X μ l	
模板 RNA，在第 4 步加入	X μ l	
总体积	10 μ l	

* 也可根据实验具体需要，加入基因特异性引物

操作步骤 B:

一 使用之前的预处理（可选步骤）:

- 1 在 qPCR 反应体系中加入 1U 的尿嘧啶糖基化酶（UDG）。
- 2 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 分钟以去除任何残留的污染。
- 3 95 $^{\circ}$ C 加热 10-15 分钟，使 UDG 酶失活。
UNG/UDG 酶在低于 40 $^{\circ}$ C 时发挥作用，确保 HotMaster 抑制剂与 Taq 酶的结合。

二 SYBR 检测方法:

请注意将 2.5 \times RealMasterMix 和 20 \times SYBR solution 避光保存。

- 1 20 \times SYBR solution 在室温下平衡并彻底混匀。
- 2 将 125 μ l 20 \times SYBR solution 加入至 1.0 ml 2.5 \times RealMasterMix 中。
加入 20 \times SYBR solution 的 2.5 \times RealMasterMix 溶液在-20 $^{\circ}$ C 可以保存三个月。
在使用前务必彻底混匀 RealMasterMix/SYBR solution。如果解冻后并没有使用，一定要注意在再次冷冻前彻底混匀。
RealMasterMix/SYBR solution 不能用于杂交探针法。
- 3 根据实验需求及逆转时总 RNA 量，对获得的 cDNA 进行适当的稀释，进行荧光定量反应。逆转录产物的加量应不超过荧光 PCR 体系终体积的 1/10。

反应体系:

组成成分	50 μ l 体系	25 μ l 体系	20 μ l 体系	终浓度
2.5 \times RealMasterMix /20 \times SYBR solution	22.5 μ l	11.25 μ l	9 μ l	1 \times
正向引物	-	-	-	100-300nM
反向引物	-	-	-	100-300nM
DNA 模板	-	-	-	-ng-pg
超纯水	至 50 μ l	至 25 μ l	至 20 μ l	-