

Bestar[®] one step RT qPCR kit (SyBR Green)

产品名称	Bestar [®] one step RT qPCR kit (SyBR Green)
DBI-2223	100 Reaction (50ul)
DBI-2224	200 Reaction (50ul)
DBI-2225	1000 Reaction(50ul)

●储存条件

-20°C长期保存。反复冻融不影响使用效果；如果频繁使用，建议储存于4°C。

●产品简介

➤ Bestar[®] one step RT qPCR kit (SyBR Green) 是公司经过多次实验，不断创新，研究出的 one step qPCR kit, 该试剂盒成功使 RT 和 qPCR 两步反应于一个反应管内完成。操作非常简单，并且反应中途无需任何操作，能够有效防止样品污染，并且避免了二次操作污染的风险。

➤ 本试剂盒成份经过优化改良，可以抑制非特异性反应。

●产品主要成份 (50ul体系*200次量)

名称	数量
2×one step qPCR kit mix (SyBR Green)	1ml×5支
RT Enzyme mix	200ul×1支
50×ROX Reference Dye	200ul×1支

备注：50×ROX Reference Dye 用于校正加样孔之间的体积误差和荧光信号误差，用于以下荧光定量仪器，使用方法如下：

仪器名称	使用浓度
ABI PRISM 7000/7700/7900HT 和 7300 /Step One™/ Step One Plus™ Real-Time PCR System 荧光定量 PCR 仪器	使用ROX Reference Dye 终浓度为1×
ABI 7500、7500 Fast Real-Time PCR System 和 Agilent Technologies 公司的 Mx3000P 荧光定量 PCR 仪器	使用ROX Reference Dye 终浓度为0.1×

说明：1: qPCR实验时，在配置反应孔mix之前，每1ml Mix中加入40ul 50×ROX(qPCR实验仪器型号决定加入体积)或者50×ROX 4ul,用1ml移液器轻轻混匀。

2: 不用Reference Dye 校正的qPCR扩增仪器，使用时无需添加ROX。

● 试剂盒特点

Bestar[®] one step RT qPCR kit (SyBR Green) 4大特点

- ❖ 应用范围广泛，能够快速、准确测定总 RNA、mRNA、RNA 病毒等样品。
- ❖ RT 酶能够耐受高温反应 50°C，反应条件能够打开 RNA 链中的复杂结构，获得完整的 cDNA 模板。
- ❖ 使用 Bestar[®] Taq DNA polymerase 能极大程度的降低 qPCR 实验中非特异性反应。
- ❖ one step RT qPCR Buffer 优化系统，能够获得精准、稳定的实验数据。

● 操作注意

以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前请认真阅读：

- ❖ 使用RT Enzyme mix时，需轻微混匀，小心避免起泡，低速离心收集至管底使用。
- ❖ 冻结产品融解后，请上下颠倒轻轻均匀混合，避免起泡，并轻微离心后使用。
- ❖ 融解后的试剂请于冰上放置。
- ❖ 本产品中不含有实验使用的引物。
- ❖ 反应液的配制、分装请一定使用新的（无污染的）枪头、Microtube 等，尽量避免污染。

● one step RT qPCR实验操作顺序

1. 溶解试剂，上下颠倒混匀，确认反应溶液完全溶解。（避免使用振荡器混匀，剧烈振荡会降低制品性能）。
2. 配制one step RT qPCR反应混合液，分装至qPCR反应管中。
3. 添加one step RT qPCR扩增用RNA模板。
4. 使用Real Time PCR扩增仪，进行qPCR扩增反应实验。
5. 反应液配制方法和one step RT qPCR扩增条件请参照使用方法。
6. Real Time PCR仪的使用方法，请参照各种仪器说明书。
7. 本产品采用了经过化学修饰型Bestar[®] Taq DNA Polymerase，请按照推荐的实验方法进行Hot Start法PCR扩增。

重要提示:

本产品中使用经过化学修饰Bestar® Taq DNA Polymerase, 与其他公司的抗体型Hot Start用DNA聚合酶相比, 90℃以下避免了副反应的产生, 需要PCR反应前的95℃ 2分钟酶的活性化反应。如果高温处理时间太长, 会使酶的活性下降, 其PCR的扩增效率、定量精度等都会受到影响。如果在PCR反应前进行模板的预变性, 推荐设定为95℃ 2分钟。

● 操作方法

- ◆ 用ABI PRISM 7000/7700/7900HT, 7300 System的操作方法请按照Applied Biosystems公司的仪器使用说明书要求进行实验操作(其它类型的荧光定量PCR仪器请按照说明书操作)。

1) 按下列组份配制PCR反应液:

试剂名称	使用量		
2×one step qPCR kit mix (SyBR Green)	10ul	12.5ul	25ul
RT Enzyme mix	0.4ul	0.5ul	1ul
50×ROX Reference Dye	0.4ul	0.5ul	1ul
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5ul	0.5ul	1ul
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5ul	0.5ul	1ul
RNA模板	1ul	1ul	2ul
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	7.2ul	9.5ul	19ul
Total	20ul	25ul	50ul

备注:

1. 在每孔反应液中RNA模板量小于200ng。
2. 96孔板、Single-Tube、8联Tube采用50ul反应体系, 384孔板、96-well Fast Thermal Cycling plate采用20ul反应体系。

2) 进行one step qPCR反应。

建议采用下列显示的三步法PCR反应程序, 如果该程序得不到良好的实验结果时, 再进行PCR条件的优化(如采用二步法快速扩增程序)。

三步法one step qPCR扩增标准程序:

RT: 42℃ 30min

Stage 1: 预变性

Reps: 1

95℃ 2min

Stage 2: PCR反应

95℃ 10秒

60℃ 30~34秒*

72℃ 30秒

40 cycles

退火温度根据引物来设定。

使用7700和7900HT时请设定在30秒。

使用7000和7300时请设定在31秒。

使用7500时请设定在34秒。

Stage 3: 融解曲线

95℃ 1min

55℃ 1min

55℃-98℃ (10sec/cycle 0.5℃/cycle) 86cycles

3) 实验结果分析。

反应结束后确认one step qPCR的扩增曲线和融解曲线, 使用qPCR仪器分析软件进行one step qPCR实验结果分析。