

ABScript II One Step SYBR

Green RT-qPCR Kit

目录号: RK20404

规格: 25RXN / 250 RXN (20 μ L/RXN)

产品组成:

2X One Step SYBR Green RT-qPCR Buffer	RM21454
ABScript II One Step Enzyme Mix	RM21455
50X ROX Dye I	RM21465
50X ROX Dye II	RM21466
Nuclease-free H ₂ O	RM20214

产品说明

ABScript II One Step SYBR Green RT-qPCR Kit 是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行一步法 RT-qPCR 反应的专用试剂盒。本试剂盒以 RNA 为模板, 使用基因特异性引物, 逆转录和 PCR 反应可在同一管内连续进行, 不用额外的开管、移液操作, 大大提高了检测通量, 并能有效防止污染。本产品可以对扩增产物进行实时检测, 显著提高了检测灵敏度, 并省略了 PCR 反应后的电泳步骤, 非常适合于一些微量 RNA 的检测。本制品整合了 ABScript II Reverse Transcriptase 和 *Taq* DNA Polymerase 的优势, 配合优化的缓冲体系后, 扩增效率和特异性进一步加强, 能稳定地进行一步法 RT-qPCR 反应。此外, 反应需要的所有酶都制成了 Enzyme Mix, 操作更加简单方便。

产品规格及组成

组分	25 RXN (20 μ L / RXN)	250 RXN (20 μ L / RXN)
2X One Step SYBR Green RT-qPCR Buffer *	250 μ L	1.25 mL X 2
ABScript II One Step Enzyme Mix **	20 μ L	200 μ L
50X ROX Dye I ***	10 μ L	100 μ L
50X ROX Dye II ***	10 μ L	100 μ L
Nuclease-free H ₂ O	1.25 mL	1.25 mL X 2

*, 注: 含有 dNTPs, Mg²⁺, SYBR Green I 等。**, 注: 含有 ABScript II Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor 和 *Taq* DNA Polymerase。

***, 注: 用于校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

保存条件

-20°C 避光

适用机型

ROX Reference Dye 适用机型

ROX 类型	qPCR 仪器
无需 ROX 参比染料	Bio-Rad iCycler 系列, Roche Light Cycler 系列, Qiagen/Corbett 系列, Eppendorf 等
50X ROX Dye I (High Rox)	ABI 7000/7300/7700/7900, ABI StepOne/StepOnePlus 等
50X ROX Dye II (Low Rox)	ABI 7500, ABI ViiA™7, ABI QuantaStudio 系列, Stratagene 系列, Corbett Rotor Gene 3000 等

*, 注: 不同仪器所需 ROX Dye 不同, 请参考上述机型。

注意事项

- 2X One Step SYBR Green RT-qPCR Buffer 在使用前请充分融解、混匀, 避免强光直射, 并注意避光保存。若同时需要配制多个 One Step RT-qPCR 反应时, 推荐将除引物与模板外的所有组分配制成预混液, 然后再分装到每个反应管, 减少试剂损失。
- 试剂盒中的 ABScript II One Step Enzyme Mix 含有高浓度甘油, 在使用前请轻轻混匀, 避免起泡; 使用前请瞬时离心。使用后立即放回 -20°C 冰箱保存。
- 反应液的配制和分装建议使用无污染的头、Microtube, 尽量避免污染。
- 为保证反应的成功, 建议使用高质量的 RNA 模板。
- 本试剂盒只能使用基因特异性引物, 不能使用随机引物或 Oligo dT 引物等进行反应。
- 设计一步法 RT-qPCR 实验的扩增引物时, 推荐扩增子在 70-200 bp, 效果最佳。

操作说明

实验准备

- 1.5 mL RNase-free EP 管、RNase-free PCR 管、移液器和枪头、冰盒或冰。
- PCR 引物与模板。
- 荧光定量 PCR 专用管或平板。

实验方法

用户需自备的试剂：RNA 模板、引物。请按照不同品牌荧光定量 PCR 仪的使用说明书要求进行实验操作。

1. 配制 One Step RT-qPCR 反应体系

推荐冰上配制反应体系。

推荐的反应体系

组分	加入量 (20 μ L 体系)	加入量 (50 μ L 体系)
2X One Step SYBR Green RT-qPCR Buffer	10 μ L	25 μ L
ABScript II One Step Enzyme Mix	0.8 μ L	2 μ L
正向引物(10 μ M) *	0.4 μ L	1 μ L
反向引物(10 μ M) *	0.4 μ L	1 μ L
50X ROX Dye **	0.4 μ L	1 μ L
Total RNA ***	2 μ L	5 μ L
Nuclease-free H ₂ O	to 20 μ L	to 50 μ L

*, 注：通常引物终浓度为 0.2 μ M 时可以得到较好的结果。反应性能较差时，可以在 0.1-1.0 μ M 范围内调整引物浓度。扩增产物的长度建议选择在 70-200 bp 范围内。

**，注：根据适用机型选择合适的 ROX Dye。

***，注：建议在 20 μ L 体系中加入 50 pg-300 ng 的 Total RNA 模板。

2. One Step RT-qPCR 反应程序

推荐的反应程序

步骤	温度	时间	循环数 (Cycles)
反转录	42°C	5 min	1
预变性	95°C	1 min	1
循环反应	95°C	5 s	40
	60°C	30-34 s*	
溶解曲线	仪器自动设置		

*, 注：延伸时间根据 qPCR 仪所需数据采集时间自行调整：如使用 StepOnePlus 时设定为 30 s；使用 7300 时设定为 31 s；使用 7500 时设定为 34 s。

反应结束后确认 One Step RT-qPCR 的扩增曲线和溶解曲线，进行标准曲线制作等。

qPCR 反应有效性确认标准

1) 线性关系及扩增效率确认

标准曲线相关系数 (R^2) > 0.98

标准曲线斜率介于 -3 至 -3.5 之间

PCR 扩增效率 (E) 介于 0.9-1.2 之间

2) 重复性确认

重复管之间的 STD < 0.2

3) 特异性确认

扩增产物溶解曲线无明显非特异性扩增产物或引物二聚体杂峰（必要时请进行琼脂糖电泳确认）

常见问题与解决方案

1) 溶解曲线出现多峰

- 引物设计不合理：根据引物设计原则重新设计。
- 引物浓度太高：适当降低引物浓度。
- RNA 模板带有基因组污染：去除模板基因组污染。

2) 扩增曲线形状异常

- 个别扩增曲线突然骤降：反应管内有气泡，由于温度升高后气泡破裂，使仪器检测到的荧光值突然降低所致。处理样本时要注意离心，加样过程中尽量避免吸打出气泡。
- 扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于 Ct 值。减小基线终点，重新分析数据。

3) 反应结束无扩增曲线出现

- 反应循环数不够：一般设置循环数为 40，但需注意过多的循环会增加背景信号，降低数据可信度。
- 确认引物是否降解：长时间未用的引物应先通过 PAGE 电泳检测完整性，以排除引物降解的可能性。
- 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段；三步法扩增程序应当将信号采集设置在 72°C 延伸阶段。
- 模板浓度太低：减少模板稀释倍数重复实验。
- 模板降解：重新制备模板，重复实验。

4) Ct 值出现太晚

- 扩增效率极低：优化反应条件，重新设计引物。
- 模板浓度太低：减少稀释倍数，重复实验。
- 模板降解：重新制备模板，重复实验。
- 产物太长：设计的扩增子长度一般为 70-200 bp。
- 反应体系中含有 PCR 抑制剂：一般为模板引入，增加模板稀释倍数或者重新制备模板。

Order: order@abclonal.com

Tech: support@abclonal.com

For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.

Please visit <http://abclonal.com> for a complete listing of recommended products.

5) 阴性对照也出现明显扩增

- a. 反应体系或者水被污染：更换新的 Buffer 或者水重复实验。
反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染。
- b. 引物二聚体的出现：在 35 循环后阴性对照出现扩增属正常情况，可配合熔解曲线进行分析。

6) 重复性差

- a. 加样体积不准：使用性能较好的移液枪，扩大反应体系，增加稀释后的组分加入体积。
- b. 定量 PCR 仪孔间温度不一致：定期校准仪器。
- c. 模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，减少模板稀释倍数或提高加样体积。