

Universal One Step RT-qPCR Fluore Green Kit

通用一步法 RT-qPCR 染料法预混液

产品简介

Universal One Step RT-qPCR Fluore Green Kit 是一款基于 SYBR Green I 染料进行荧光定量的试剂盒。使用基因特异性引物，反转录和 qPCR 反应在一管内完成，无需反复开盖和移液，大大提高检测效率，降低了污染风险。缓冲体系经过优化，对于高表达的靶标，试剂盒灵敏度可以达到 0.1 pg，中等表达的靶标，可以达到 1 pg。本试剂盒同时也适用于 DNA 样本的扩增定量。本试剂盒可实现不同动植物样本、细胞、微生物核酸的高灵敏检测和定量。

产品信息

货号	N132051E	N132051S
规格	20 T (20 μ L/rxn)	200T (20 μ L/rxn)

组分信息

组分编号	组分名称	N132051E	N132051S
N132051-A	2 $\times$ RT-qPCR Buffer	250 μ L	2 $\times$ 1.25 mL
N132051-B	RT-qPCR Enzyme Mix	20 μ L	200 μ L
N132051-C	RNase free H ₂ O	250 μ L	2 $\times$ 1.25 mL

储存条件

-25~-15 $^{\circ}$ C避光储存，有效期 1 年。

注意事项

1. 加样和配液步骤都尽量在冰上操作。
2. 每个组分在使用前都应震荡混匀，低速离心。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
4. 本产品仅用于科研。

使用说明

1. 推荐反应体系

表 1 反应体系*****

组分	体积 (μ L) ****	体积 (μ L)	终浓度
2 $\times$ Universal SG Buffer	12.5	25	1 $\times$
Universal UH Enzyme Mix	1	2	-

Forward Primer (10 μ M)**	0.5	1	0.2 μ M
Reverse Primer (10 μ M)**	0.5	1	0.2 μ M
模板 RNA***	X	X	
RNase-free ddH ₂ O	to 25	to 50	

【注】： ** 通常引物终浓度为 0.2 μ M，也可根据情况在 0.1-1 μ M 之间进行调整。

*** 该试剂灵敏度极高，Total RNA 在 1 pg – 1 μ g，人源样本测试显示最佳投入量为 1 pg – 100 ng，控制 Ct 值整体在 15-30 之间为宜。

**** 推荐使用 20 μ L 或 50 μ L，以保证目的基因扩增的有效性和重复性。

***** 请于超净工作台内配制，并使用无核酸酶残留的枪头、反应管；推荐使用带滤芯的枪头。避免交叉污染和气溶胶污染。

2. 反应程序

表 2 标准扩增程序

循环步骤	温度	时间	循环数
反转录	50°C*	6 min	1
预变性	95°C	5 min	1
扩增反应	95°C	15 sec	40
	60°C**	30 sec	
熔解曲线	仪器默认设置		1

【注】： * 反转录温度可根据实验需求在 50-55°C 之间进行选择。对于 DNA 样本，反转录过程可省去。

** 特殊情况下退火/延伸温度可根据引物 T_m 值进行调整，建议使用 60°C。

3. 适用机型

不需要 Rox 校正的仪器型号：

Bio-Rad: CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ5, MyiQ, MiniOpticon, Opticon, Opticon 2, Chromo4;

Eppendorf: Mastercycler ep realplex, realplex 2 s;

Qiagen: Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000;

Roche Applied Science: LightCycler 480, LightCycler2.0, Lightcycler 96;

Thermo Scientific: PikoReal Cyclers; Cepheid: SmartCycler; Illumina: Eco qPCR;

Low Rox 适用机型： ABI 7500, 7500 Fast, ViiA7, QuantStudio 3 and 5, QuantStudio 6, 7, 12k Flex;

Stratagene MX3000P, MX3005P, MX4000P;

High Rox 适用机型： ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT Fast, StepOne, StepOne Plus.

4. 引物设计技巧

- 1) 引物最好应设计成跨越一个外显子-外显子连接，其中一条扩增引物可以潜在地跨越实际外显子-内含子边界。这种设计可以减少从污染的基因组 DNA 中扩增到假阳性的风险。
- 2) 引物应具有特异性。引物设计完成以后，应对其进行 BLAST 检测。

- 3) 引物长度一般在 18~27 bp, 不应过长否则导致其延伸温度过高, 不适于 Taq DNA 聚合酶反应。
- 4) 引物 GC 含量在 40%~60%, GC 含量过高或过低都不利于反应。上下游引物 GC 含量不能相差太大。
另外, 上下游引物的 Tm 值是寡核苷酸的解链温度, 即在一定盐浓度条件下, 50%寡核苷酸双链解链的温度。有效启动温度, 一般高于 Tm 值 5~10°C。可按公式 $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ 估算引物的 Tm 值, 也可以通过软件计算引物 Tm 值。
- 5) PCR 产物的长度通常控制在 80-300 bp, 为了保证扩增效率, 在设计引物时要考虑 PCR 产物的长度。
- 6) 引物 3' 末端端尽量避免为 A, 引物 3' 端错配时, 不同碱基引发效率存在着很大的差异, 当末位的碱基为 A 时, 即使在错配的情况下, 也能有引发链的合成, 而当末位链为 T 时, 错配引发效率大大降低, G、C 错配的引发效率介于 A、T 之间, 所以 3' 端最好选择 T。
- 7) 碱基要随机分布, 不要有聚嘌呤或聚嘧啶的存在。尤其 3' 端不应超过 3 个连续的 G 或 C, 因这样会使引物在 GC 富集序列区错误引发。
- 8) 引物自身及引物之间避免存在互补序列, 否则引物自身会折叠成发夹结构使引物本身复性。这种二级结构会因空间位阻而影响引物与模板的复性结合。引物自身不能有连续 4 个碱基的互补。两引物之间也不应具有互补性, 尤其应避免 3' 端的互补重叠以防止引物二聚体的形成。引物之间不能有连续 4 个碱基的互补。引物二聚体及发夹结构如果不可避免的话, 应尽量使其 DG 值不要过高 (应小于 4.5 kcal/mol)。否则易导致产生引物二聚体带, 并且降低引物有效浓度而使 PCR 反应不能正常进行。

5. 异常结果分析

1) 无 Ct 值出现

采集荧光信号的步骤有误: 在退火/延伸结束采集信号;

引物降解: 可通过 PAGE 电泳检测其完整性;

模板量不足: 对未知浓度的样品应从原液开始测试;

模板降解: 避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。

2) Ct 值偏大 (Ct > 35)

扩增效率低: 反应条件不够优化, 引物设计存在问题, 可试用三步法进行反应, 也可适当降低退火温度;

PCR 产物太长: 一般采用 80-150bp 的产物长度。

3) 标准曲线线性关系不佳

a. 加样存在误差: 使得标准品不呈梯度; RNA 模板推荐使用 $1 \times TE$ 缓冲液进行梯度稀释, DNA 模板推荐使用 ddH₂O 稀释;

b. 标准品出现降解: 应避免标准品反复冻融, 或重新制备并稀释标准品;

c. 引物设计不佳: 重新设计引物;

d. 模板中存在抑制物, 或模板浓度过高。

4) NTC 有扩增 (Ct < 32)

a. 引物设计不够优化: 应避免引物二聚体和发夹结构的出现;

b. 引物浓度不佳: 适当降低引物的浓度, 并注意上下游引物的浓度配比;

c. 气溶胶污染: 扩增产物泄露很容易在实验室中引发气溶胶污染, 一旦污染, 定量检测结果就会不准确。