

版本号: FP210831

FastKing One Step RT-qPCR Kit (SYBR)

FastKing一步法反转录-荧光定量试剂盒

(SYBR Green)

目录号: FP313

产品内容

产品组成	FP313-01 50 μ l $\times$ 50 rxn
2 $\times$ FastKing RT-qPCR Buffer (SYBR Green)	1.25 ml
25 $\times$ RT-PCR Enzyme Mix	100 μ l
50 $\times$ ROX Reference Dye	250 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml

储存条件

请将该试剂盒置于-30~-15 $^{\circ}$ C避光保存, 保质期1年。

适用的Real Time PCR扩增仪

ABI PRISM 7000/7700/7900HT, 7300/7500, 7500 Fast, ViiA 7, QuantStudio[™], StepOne[™]/ StepOne Plus[™], 12K Flex (Applied Biosystems)

OPTICON[™], CFX系列 (BIORAD)

Smart Cycler[®] System (Cepheid)

Mx3000 P/Mx3005P (Stratagene)

Line-Gene (Bioer, 杭州博日)

Roche系列

其他各种Real Time PCR扩增仪

产品简介

本制品是采用SYBR Green I嵌合荧光法进行Real Time One Step RT-qPCR的专用试剂。使用本制品进行Real Time One Step RT-qPCR反应可在同一反应管内连续进行，操作简单，避免了样品间交叉污染的同时也提高了检测的灵敏度。

本试剂盒中的25×RT-PCR Enzyme Mix为TIANGEN新型逆转录酶(FastKing RTase)、新型抗体修饰热启动Taq DNA聚合酶和RNase Inhibitor的预混Mix形式，其中的FastKing RTase，是分子改造后的新型逆转录酶，特别增加了疏水motif，具有更强的RNA亲和性和热稳定性，提高了该酶的逆转录效率和对具有复杂二级结构RNA模板的延伸能力；PCR过程中采用了性能优良的新型热启动Taq DNA聚合酶，使得逆转录后的PCR反应具更高的扩增效率和特异性。另外，本产品中的2×FastKing RT-qPCR Buffer (SYBR Green)是专门为上述两种关键酶而优化的新型反应体系，其中包含必要离子组分、dNTPs、SYBR Green染料以及One Step 稳定剂和增强剂，可保证FastKing RTase和新型热启动Taq DNA聚合酶在整个一步法反应过程中发挥优良功效。

本制品可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对多种高低丰度的靶基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。

产品特点

提高反应效率：性能优良的逆转录酶和Taq酶保证了高的反应效率；

操作简单快速：双组分的产品形式使得操作过程变得简单快速；

通读复杂模板：能够作用于GC含量高，二级结构复杂的RNA模板；

样品普适性高：对不同物种来源及杂质较多的RNA模板的适用性高。

用户自己需要准备的

1. 引物；
2. 模板；
3. 一次性手套及其它耗材；

适用范围

RT-qPCR技术可用于检测细胞和组织中的基因表达水平及RNA病毒的含量。

操作步骤

1. 完全融化模板RNA，特异性引物，2×FastKing RT-qPCR Buffer (SYBR Green)，50×ROX Reference Dye和RNase-Free ddH₂O，短暂离心后置于冰浴上。
2. 按下表在冰浴条件下配制反应液：

组成成分	体积/反应
2×FastKing RT-qPCR Buffer (SYBR Green)	25 µl
25×RT-PCR Enzyme Mix	2 µl
上游特异性引物(10 µM)	1.25 µl ^{*1}
下游特异性引物(10 µM)	1.25 µl ^{*1}
RNA模板	10 pg-1 µg total RNA
50×ROX Reference Dye ^{*2}	根据不同仪器添加
RNase-Free ddH ₂ O	补水至50 µl
总体系	50 µl

^{*1} 引物终浓度为0.25 µM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时，可增加PCR反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少PCR反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的，可以在0.05-0.90 µM范围内调整。

^{*2} 几种常见仪器的匹配ROX Reference Dye浓度见下表：

仪器	终浓度
ABI 7000/7300/7700/7900/7900HT/7900HT Fast、StepOne™/ StepOne Plus™	5×(例如：5 µl ROX/50 µl 体系)
ABI 7500/7500 Fast、ViiA 7、QuantStudio™ 3/5/6 Flex/7 Flex/12K Flex；Agilent Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000	1×(例如：1 µl ROX/50 µl体系)
Roche仪器，Bio-Rad仪器，Eppendorf仪器等	不用添加

3. 进行Real Time One Step RT-qPCR反应

PCR反应管用离心机瞬时离心后放入荧光定量PCR仪中进行Real Time PCR反应。建议采用下列图表显示的标准PCR反应程序，如果使用该程序得不到良好的实验结果时，再进行PCR条件的优化。



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

反应步骤（建议）

反应温度	反应时间	反应循环数	说明
50°C	30 min	1	逆转录
95°C	3 min	1	预变性
95°C	15 sec	40	PCR循环步骤，
60°C	30 sec		请在该步骤收集荧光
熔解曲线分析（Melting/Dissociation Curve Stage）			

4. 实验结果分析

反应结束后确认Real Time One Step RT-qPCR的扩增曲线、熔解曲线、CT值、标准曲线等，并进行qRT-PCR定量结果分析。

注意事项

1. RNA 模板可以采用总RNA 或mRNA，建议使用TIANGEN公司生产的TRNzol，RNAprep Pure或RNA Easy Fast系列制备高质量的总RNA。
2. 一步法RT-qPCR实验应避免RNase污染，可采用以下措施：
 - 1) 因人的皮肤表面和唾液都有RNase，因此实验中应佩戴一次性手套和口罩；
 - 2) 一步法RT-qPCR实验应使用专门的仪器和耗材，建议在专门区域操作RNA；
 - 3) 一步法RT-qPCR实验相关耗材应用0.1% DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液在37°C 处理12 h，并高压灭菌30 min后使用。
3. 25×RT-PCR Enzyme Mix在取用之前应短暂离心收集溶液后再吸取，吸取时动作要慢，使用后应尽快放回-30~-15°C。
4. 2×FastKing RT-qPCR Buffer (SYBR Green)在取用前应充分混匀并离心后使用。