



One Step qRT-PCR Kit(SYBR Green)

使用说明书

【产品简介】

本制品是适用于染料法进行RNA定量实验的专用试剂, Real-Time PCR方法以其卓越快速性及定量性被广泛应用于科研领域, 使用本制品可以准确简便地进行RNA的定量或定性分析。本试剂盒采用高效的反应体系, 利用一步法使RT和PCR在同一反应体系中进行, 反应过程中不需要添加试剂, 无需打开管盖, 避免了污染, 同时提高了检测的灵敏度, 可检测低至0.01pg的总RNA。本试剂盒可直接的用于对RNA模板的绝对定量的分析实验。

【试剂盒组成】

试剂盒组成	LK-0111A (30 μ l \times 50 次)	LK-0111B (30 μ l \times 100 次)
One Step PCR Master Mix(2 \times)	1ml \times 1 支	1ml \times 2 支
One Step PCR Enzyme Mix	50 μ l \times 1 支	100 μ l \times 1 支
RNase Free ddH ₂ O	1ml \times 1 支	1ml \times 2 支
说明书	1 份	1 份

【适用荧光 PCR 仪器】

以下机型需要另购 Rox Reference Dye(25mM)货号: LK-0114。

注意: ABI Prism7500, ABI Prism7500 Fast, MJ Research Chromo4, Corbett Rotor Gene 3000 机型, 添加 ROX Reference Dye 0.4 μ l/反应 (0.1X)。

ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One, ABI Step One Plus 机型, 添加 ROX Reference Dye 0.4 μ l/反应(1X)。

【试剂运输及储存条件】

试剂盒运输可在2-8 $^{\circ}$ C环境下进行。储存时, 须置-20 $^{\circ}$ C避光保存。有效期为12个月, 请在有效期内使用。

【操作步骤】

1. 完全融化模板, 将特异性引物及试剂盒中的试剂离心后置于冰浴上。
2. PCR 试剂准备: 在冰浴条件下按下表配制反应液 (举例)
一步法 PCR 反应:

反应成分	体积/反应	终浓度
One Step PCR Master Mix(2 \times)	15 μ l	1 \times
One Step PCR Enzyme Mix	1 μ l	
Forward Primer (20 μ M)	0.15-0.3 μ l	0.1-0.2 μ M
Reverse Primer (20 μ M)	0.15-0.3 μ l	0.1-0.2 μ M
RNA 模板	2-5 μ l	
RNase Free ddH ₂ O	补水至 30 μ l	
总体系	30 μ l	

3. PCR扩增检测 (在扩增检测区进行)

循环参数设定: (请参照各类仪器的操作软件进行设置)

步骤	温度	时间	循环数
1 反转录反应	42-50 $^{\circ}$ C	15-30分钟	1
2 预变性	94 $^{\circ}$ C	2分钟	1
3 变性	94 $^{\circ}$ C	15秒	40



	退火	55℃	30-60秒	
	延伸及检测荧光	72℃	30-90秒	
步骤3中进行荧光检测				

结果检测：反应结束后取 10μl 反应产物，琼脂糖凝胶电泳检测。

【注意事项】

- 1.待检标本若不及时检测，应保存于-20℃。
- 2.实验相关耗材应用0.1%DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液在37℃处理12小时，并高压灭菌30分钟后使用。
- 3.试剂盒各组份使用前请充分融化并摇匀，离心管内的试剂需离心数秒后使用。
- 4.PCR操作各阶段应在不同实验区域进行，包括PCR扩增试剂准备区、标本处理区及PCR扩增检测区。
- 5.人的皮肤表面和唾液都有RNase，应穿工作服，戴一次性手套（经常替换手套），使用一次性用品。
- 6.PCR操作人员应具有经验和受过培训。
- 7.操作过程中用到的超净台、加样枪、离心机、扩增仪等仪器设备应经常用10%次氯酸或70%乙醇及紫外灯处理。
- 8.实验中废弃的吸嘴应弃于含10%次氯酸的废液缸中，以防止污染。
- 9.实验后，扩增管切勿打开，并且将其丢弃在实验区以外区域。

注：本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。