

## Power Green One-step RT-qPCR Kit

货号/规格: V6001-A/200 rxns; V6001-B/5000 rxns

### 产品简介

Power Green One-step RT-qPCR Kit 是一步法逆转录-荧光定量 PCR 试剂盒, 本品含逆转录酶、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、SYBR Green I 染料等逆转录及 qPCR 反应所需的试剂, 仅需加入 RNA (如病毒 RNA) 和引物, 即可在同一反应管内进行逆转录和染料法 qPCR。本品减少了实验操作的步骤, 不但提高了检测的效率, 而且降低了污染的风险。试剂盒以便捷的 Master Mix 形式提供。Power Green 1-step Enzyme Mix 含耐热逆转录酶和抗体法修饰的热启动 DNA 聚合酶, 可以在 55°C 保持稳定的活性, 保证极高的逆转录效率; 热启动 Taq 酶配合优化的缓冲体系, 保证 Power Green One-step RT-qPCR Kit 极高的灵敏度和特异性。2X Power Green 1-step Reaction Mix 包含优化的缓冲体系和 SYBR Green I 染料, 适用于 SYBR/FAM 通道检测。

### 产品组成

Component	V6001-A (200 rxns, 20 $\mu$ L/rxn)	V6001-B (5000 rxns, 20 $\mu$ L/rxn)
2X Power Green 1-step Reaction Mix <sup>a</sup>	1 mL $\times$ 2	25 mL $\times$ 2
Power Green 1-step Enzyme Mix <sup>b</sup>	200 $\mu$ L	1 mL $\times$ 5

a 包含 dNTPs、SYBR Green I 及反应缓冲液等。

b 包含逆转录酶, RNase 抑制剂, Hotstart Taq DNA 聚合酶等。

### 保存条件

-20°C 避光保存, 尽量避免反复冻融, 有效期 24 个月。

### 质量控制

纯度检测: 经质量检测, 产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测: 经不同来源的模板和引物检测, 产品具有优秀的特异性、灵敏性及可重复性等。

### 注意事项

- ① 本品尽量避免反复冻融, 短期使用可避光保存于 4°C。使用前 Mix 需要于室温完全解冻, 充分混匀, 置于冰上备用。
- ② 本品灵敏度较高, 在配制反应体系时注意避免气溶胶污染引起非特异性扩增。
- ③ 将 (n+x) 份反应液混匀后再分注到 n 个单管中, 可降低加样误差。(n 为重复制数, x 为损耗量, 一般为 n 的 1/10)。
- ④ 轻轻混匀反应液, 避免产生气泡, 气泡会干扰荧光检测。可瞬时离心去除气泡。
- ⑤ 引物的特异性、用量以及退火温度是影响实验结果的重要因素。务必设计特异性好的引物, 随实验结果适当调整引物用量 (0.05-0.9  $\mu$ M) —— 特异性较差时减少引物用量, 或以 3°C 为增量提高退火温度, 扩增效率较低时增加引物用量。
- ⑥ DNA 模板的量应小于 1000 ng/反应, 过高的模板量会引起非特异性扩增。应根据模板类型与基因表达量适当调整用量。
- ⑦ 溶解曲线的采集不是必须的, 初次使用的引物建议进行溶解曲线采集。溶解曲线可以看出产物的特异性。产物特异性不好的原因有: 引物特异性低; 退火温度设置偏低; 引物/模板浓度偏高; 等。同时, 建议通过琼脂糖凝胶电泳检测产物的特异性。
- ⑧ 本品不含参比染料, 请根据仪器类型及实验需求进行选择。下表仅供参考:

Instruments	Final Conc. of ROX
ABI PRISM 7000/ PRISM 7700/ 7300/ 7900HT/ StepOne/ StepOnePlus/ GeneAmp 5700	500 nM, high ROX
ABI 7500/ 7500 Fast/ ViiA 7/ QuantStudio 6/7/12K Flex; Agilent Stratagene Mx3000P/ Mx3005P/ Mx4000	50 nM, low ROX
Bio-Rad CFX96/ CFX384/ iQ/ iQ5; MJ Research Opticon 2/ Chromo 4; Roche LightCycler 480/ 96; Corbett Rotor Gene G/ Q/ 3000/ 6000; Thermo PikoReal 96; Eppendorf MasterCycler ep realplex; Cepheid Smart Cycler	No ROX

### 应用举例

#### 1. 配制反应体系

请于冰上配制以下反应体系:

Component	Volume	Final concentration
2X Power Green 1-step Reaction Mix	10 $\mu$ L	1 $\times$
Power Green 1-step Enzyme Mix	1 $\mu$ L	–
Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
Template RNA	variable	<1 $\mu$ g
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	To 20 $\mu$ L	–

以上组分的用量可以参照以下原则进行调整：

- 模板建议用量（20  $\mu$ L 体系）：1-4  $\mu$ L。加样体积不宜过小，以免造成较大的误差。
- 引物终浓度建议范围：0.1-1.0  $\mu$ M，通常引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 效果较好。
- 产物大小建议范围：80-200 bp。

## 2. 设定反应程序进行 RT-qPCR 反应

根据定量仪器选择“SYBR”或“SYBR/FAM”通道，参考以下反应程序进行检测：

Stage	Temperature	Time	Cycle
Reverse transcription	50~55°C <sup>a</sup>	10 min	1
Initial denaturation	95°C	1 min	1
Amplification	Denaturation	95°C	10 sec
	Annealing&Extension <sup>b</sup>	60°C	30 sec
Melting curve analysis (optional) <sup>c</sup>	95°C	15 sec	1
	60°C	60 sec	
	95°C	15 sec	

a. 对于具有复杂二级结构或高 GC 区域的模板，可以通过提高逆转录温度至 55°C 来提高扩增的效率和灵敏度。

b. 请在此步设置进行信号采集。延伸时间应根据所用机型的信号收集时间限制来设置，如 ABI 7700 和 7900HT 至少需要 30 秒，ABI 7000 和 7300 至少需要 31 秒，ABI 7500 至少需要 34 秒。

c. 请根据仪器指南进行熔解曲线采集设置。

## 3. 分析结果

按照仪器使用说明进行数据分析。

本品仅供科学研究使用。