

NovoScript® SYBR Two-Step qRT-PCR Kit

目录号: E093

产品描述:

NovoScript® SYBR Two-Step qRT-PCR SuperMix两步法RT-qPCR试剂盒的是基于本公司NovoScript® 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (Cato: E043) 和NovoStart® SYBR qPCR SuperMix (Cato: E090) 进行研发生产, 具有高灵敏度, 高效合成能力和扩增效率。该试剂盒能以动物、植物和微生物的总RNA或mRNA为模板, 用NovoScript® 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix进行反转录, 用NovoStart® SYBR qPCR SuperMix进行荧光定量。

本制品配有不同浓度的ROX Reference Dye, 用于不同仪器校正孔间荧光信号误差。

ROX I校准的Real Time PCR仪有:

ABI 5700/7000/7300/7700/7900 HT/7900 HT Fast; ABI StepOne/StepOnePlus及其他仪器。

用ROX II校准的Real Time PCR仪有:

ABI 7500/7500 Fast; ABI ViiA7; ABI Q6;ABI Quant Studio 6/7 Flex; Stratagene MX4000/MX3500P/MX3000P及其他仪器。

不需要用ROX校准的Real Time PCR仪有:

Bio-Rad CFX96/CFX 384/iCycler iQ5/ iQ /My iQ5/MiniOpticon/Opticon/Opticon /Chromo4; Eppendorf MasterCyclerrealplex/ realplex 2s。
Cepheid SmartCycler; Illumina Eco qPCR;
Roche Applied Science LightCycler 480;
Thermo Scientific PikoReal Cycler;
Qiagen/Corbett Rotor-Gene Q/Rotor-Gene 3000/ Rotor-Gene 6000及其他仪器。

保存温度: -20°C。

产品包装:

产品组成	A 包装	B 包装
2×NovoStart® SYBR qPCR SuperMix	1ml×3	1ml×15
NovoScript® 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix	500µl	2.5ml
RNase Free Water	1ml×5	1ml×25
ROX Reference Dye I	200µl	1ml
ROX Reference Dye II	200µl	1ml

注意事项:

- 1) 用 DEPC 处理实验用到的所有实验器材, 或者购买已经证明无核酸酶的实验用具, 实验过程戴手套并经常更换手套, 避免 RNA 酶的污染。
- 2) 确保所用试剂及超纯水中无 RNA 酶污染。
- 3) 试剂盒要严格密封保存。在反转录过程中, 所有管子要确保扣严。
- 4) 纯化过的 RNA 必须保证不含有盐, 金属离子, 乙醇和苯酚, 以上成分会干扰第一链 cDNA 的合成反应。可采用乙醇沉淀 RNA 的方法去除痕量污染物。
- 5) 为保证反转录反应的有效进行, 需使用高质量的 RNA 模板。

操作方法:

I. 第一链 cDNA 合成

融化后, 将试剂盒中各组分混匀并稍微离心后置于冰上。

1) 按顺序加入以下反应物:

模板 RNA	总 RNA(0.1 ng -5μg)
	poly(A) mRNA(10 pg)
	特异性 RNA(0.01 pg)
2×NovoScript® 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix	10μl
RNase Free Water	至 20μl

2) 如果 RNA 模板 GC 含量高或者含有二级结构, 可先将 RNA 模板和 RNase Free Water 混匀后, 65°C 孵育 5 分钟, 冰上冷却, 再加入其它组分。

3) 轻轻混匀, 离心。42°C 孵育 15-30 分钟。如果 RNA 模板中不含 poly A 结构, 25°C 先孵育 5 分钟, 随后 42°C 孵育 15-30 分钟。反应产物可直接用于 PCR, 如果不立即使用, -20°C 保存少于一周, 长时间保存建议-70°C 放置。

II. 实时定量

合成的第一链cDNA可直接用于PCR或qPCR。第一链cDNA反应液体积不能超过PCR反应体系的1/10。通常50 μl的PCR反应体系中, 第一链cDNA反应液加入2μl。

常用反应体系 (20μl):

2×NovoStart® SYBR qPCR SuperMix	10μl
上游引物	0.2-1.0μM (终浓度)
下游引物	0.2-1.0μM (终浓度)
模板	1-2μl
RNase Free Water	至 20μl

常用 PCR 循环*:

*两步法可获得高特异性, 三步法可获得高扩增效率。

两步法扩增程序:

94°C,	5min;
35-40 次循环	{ 95°C, 15s; 60°C, 1min

三步法 PCR 扩增程序:

94°C,	5min;
35-40 次循环	{ 95°C, 15s; 50-60°C, 20s; 72°C, 30s