

Version: AH 3.2 (2021.04.01修订)

# SPARKscript II SYBR One Step qRT-PCR Kit

目录号: AH0301

## 01/产品组分

序号	组分	AH0301 250 rxn (20μL/rxn)
1	2×One Step SYBR Green Mix	1.25 mL×2
2	One Step SYBR Green Enzyme Mix	250 μL
3	RNase Free H <sub>2</sub> O	1.25 mL×2
4	50×ROX Reference Dye 1*	100 μL
5	50×ROX Reference Dye 2*	100 μL

\*ROX Reference Dye用于校正孔与孔之间的荧光信号误差。不同机型使用情况参见下表:

ROX Reference Dye 1	ABI 5700/7000/7300/7700 /7900/7900HT/7900HT Fast , ABI Step One, ABI Step One Plus
ROX Reference Dye 2	ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™7, Quant Studio 3/5/ 6 Flex/7 Flex/12k Flex, Stratagene MX4000, MX3005P, MX3000P
不需要ROX Reference Dye	Bio-Rad iQ5/Chromo4/iCycler iQ/CFX96/CFX384/Opticon/Opticon 2/MyiQ/MiniOpticon, Eppendorf realplex 2s/Mastercycler ep realplex, Qiagen Rotor-Gene Q/Rotor-Gene 3000/Rotor-Gene 6000 , Roche LightCycler 2.0/LightCycler 96/ LightCycler 480

## 02/保存条件

本产品所有组分-20℃保存，2×One Step SYBR Green Mix 于-20℃避光保存。

## 03/产品概述

本试剂盒采用 SYBR Green I 嵌合荧光法，专为以 RNA 为模板（如 RNA 病毒）的定量 PCR 检测而设计。试剂盒以便捷的 Master Mix 形式提供，使用基因特异引物（GSP），逆转录和 PCR 反应在一管内完成，不需要额外的开管/移液操作，大大提高了检测通量，并降低了污染的风险。2×One Step SYBR Green Mix 包含优化的缓冲体系、dNTP、特异性增强因子和 SYBR Green I 荧光染料，Buffer 中加入的增强因子可以有效减少引物二聚体的形成，提高特异性。One Step SYBR Green Enzyme Mix 整合比例优化的 SPARKscript II H- Minus M-MuLV

Reverse Transcriptase 和 Spark HotMaster Taq DNA Polymerase 的优越性能，配合经过优化的缓冲体系以及 RNase inhibitor，检测灵敏度可达到 1 pg 总 RNA。

## 04/质量控制

所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶、RNase 残留。

功能测试：以 HeLa 细胞总 RNA 为模板，扩增 B2M 基因。扩增效率在 0.95-1.05 之间，且模板量为 1 pg 时 CT 值在 35 以内。

## 05/注意事项

### 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 本制品含独立包装参比染料 ROX，客户可根据 qPCR 仪器技术指导决定是否加 ROX 和加入浓度，用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。
- ◇ SYBR Green Enzyme Mix 含有高浓度的甘油，使用前请短暂离心，收集到反应管底部，并用移液枪轻轻吸打，充分混匀后准确吸取。
- ◇ 使用 2×One Step SYBR Green Mix 时，请避免强光照射，并注意避光保存。
- ◇ 建议各组分冰上融化后，轻轻上下颠倒混合均匀，避免起泡，并瞬时离心后使用；PCR 反应液在冰上配制，反应液的配制请使用 RNase Free 枪头、EP 管等，尽量避免污染；

## 06/建议PCR条件（以不同机型举例，选择本实验室机型程序即可）

需要 ROX Reference Dye 2 校准的操作方法，以 ABI 7500 为例；以 10 μL，20 μL 反应体系为例，其他体系可以按照表格 Final Concentration 所示比例进行调整配制：

### 1. 配制PCR反应液：

Components	Volume (10 μL)	Volume (20 μL)	Final Concentration
RNA 模板	Total RNA: 0.5 pg-0.5 μg	Total RNA: 1 pg-1 μg	as required
2×One Step SYBR Green Mix	5 μL	10 μL	1×
One Step SYBR Green Enzyme Mix	0.5 μL	1 μL	~
50×ROX Reference Dye 2	0.2 μL	0.4 μL	as required
Gene Specific Forward Primer (10 μM)	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
Gene Specific Reverse Primer (10 μM)	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
RNase Free H <sub>2</sub> O	up to 10 μL	up to 20 μL	

▲ 反应体系中各成分的量可根据以下原则进行调整：

- 1) 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 μM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在 0.1-1.0 μM 范围内调整引物浓度。
- 2) qPCR 灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。因此推荐您将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。

3) 扩增产物长度请选择在 100 bp-500 bp 范围内，尤其推荐 100 bp-200 bp 之内。

2.按下列条件进行One Step qRT-PCR反应:

Stage 1	逆转录	Reps: 1	50°C*1	3 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95°C	5 min
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95°C	10 sec
			60°C	34 sec*2
Stage 4	融解曲线	Reps: 1*3	default	

1.对于具有复杂二级结构或高 GC 区域的模板，将逆转录温度提高到 55°C，有助于提高扩增效率和灵敏度。逆转录时间可延长至 15 min，有助于提高 cDNA 产量。

2.延伸时间请根据您使用的 Real Time PCR 仪所需要的数据收集最短时间限制自行调整：使用 ABI 7500 时至少 34 sec。

3.仪器类型不同，融解曲线曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

3.反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线及融解曲线，进行标准曲线制作等。不要用电泳检测，以防止扩增产物污染。

**需要 ROX Reference Dye 1 校准的操作方法，以 ABI Step One Plus 为例；以 10 μL，20 μL 反应体系为例，其他体系可以按照表格**

**Final Concentration 所示比例进行调整配制：**

1.配制PCR反应液：

Components	Volume (10 μL)	Volume (20 μL)	Final Concentration
RNA 模板	Total RNA: 0.5 pg-0.5 μg	Total RNA: 1 pg-1 μg	as required
2×One Step SYBR Green Mix	5 μL	10 μL	1×
One Step SYBR Green Enzyme Mix	0.5 μL	1 μL	~
50×ROX Reference Dye 1	0.2 μL	0.4 μL	as required
Gene Specific Forward Primer (10 μM)	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
Gene Specific Reverse Primer (10 μM)	0.2 μL	0.4 μL	0.2 μM each
RNase Free H <sub>2</sub> O	up to 10 μL	up to 20 μL	

▲ 反应体系中各成分的量可根据以下原则进行调整：

1) 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 μM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在 0.1-1.0 μM 范围内调整引物浓度。

2) qPCR 灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。因此推荐您将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。

3) 扩增产物长度请选择在 100 bp-500 bp 范围内，尤其推荐 100 bp-200 bp 之内。

2.按下列条件进行One Step qRT-PCR反应:

Stage 1	逆转录	Reps: 1	50°C*1	3 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95°C	5 min
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95°C	10 sec
			60°C	30 sec*2
Stage 4	融解曲线	Reps: 1*3	default	

1.对于具有复杂二级结构或高 GC 区域的模板，将逆转录温度提高到 55°C，有助于提高扩增效率和灵敏度。逆转录时间可延长至 15 min，有助于提高 cDNA 产量。

2. 延伸时间请根据您使用的 Real Time PCR 仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用 ABI 7700 和 7900HT 时至少 30 sec；使用 ABI 7000 和 7300 时至少 31 sec，使用 ABI Step One Plus 时至少 10 sec。

3. 仪器类型不同，融解曲线曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

3. 反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线及融解曲线，进行标准曲线制作等。不要用电泳检测，以防止扩增产物污染。

不需要 ROX Reference Dye 校准的操作方法，以 Roche LightCycler 480 为例；以 10  $\mu$ L，20  $\mu$ L 反应体系为例，其他体系可以按照表

格 Final Concentration 所示比例进行调整配制：

1. 配制 PCR 反应液：

Components	Volume (10 $\mu$ L)	Volume (20 $\mu$ L)	Final Concentration
RNA 模板	Total RNA: 0.5 pg-0.5 $\mu$ g	Total RNA: 1 pg-1 $\mu$ g	as required
2 $\times$ One Step SYBR Green Mix	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	1 $\times$
One Step SYBR Green Enzyme Mix	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	~
Gene Specific Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L	0.4 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M each
Gene Specific Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L	0.4 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M each
RNase Free H <sub>2</sub> O	up to 10 $\mu$ L	up to 20 $\mu$ L	

▲ 反应体系中各成分的量可根据以下原则进行调整：

- 1) 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在 0.1-1.0  $\mu$ M 范围内调整引物浓度。
- 2) qPCR 灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。因此推荐您将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。
- 3) 扩增产物长度请选择在 100 bp-500 bp 范围内，尤其推荐 100 bp-200 bp 之内。

2. 按下列条件进行 One Step qRT-PCR 反应：

Stage 1	逆转录	Reps: 1	50 $^{\circ}$ C <sup>*1</sup>	3 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95 $^{\circ}$ C	5 min
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95 $^{\circ}$ C	10 sec
			60 $^{\circ}$ C	30 sec <sup>*2</sup>
Stage 4	融解曲线	Reps: 1 <sup>*3</sup>	default	

1. 对于具有复杂二级结构或高 GC 区域的模板，将逆转录温度提高到 55 $^{\circ}$ C，有助于提高扩增效率和灵敏度。逆转录时间可延长至 15 min，有助于提高 cDNA 产量。

2. 延伸时间请根据您使用的 Real Time PCR 仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整。

3. 仪器类型不同，融解曲线曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

3. 反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线及融解曲线，进行标准曲线制作等。不要用电泳检测，以防止扩增产物污染。

## 07/相关产品

AC0101 SparkZol Reagent

AC0202 SPARKeasy 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒（含基因组 DNA 清除柱）

AC1701 无液氮 RNA 样品储存液

AC1705 高效固体表面 RNase 清除剂

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: [support@sparkjade.com](mailto:support@sparkjade.com)

