

Version: AH 3.2 (2021.04.01修订)

# SPARKscript II Depolluting Probe One Step qRT-PCR Kit

目录号: AH0303

## 01/产品组分

序号	组分	AH0303 250 rxn (20μL/rxn)
1	2×One Step Depolluting Probe Mix	1.25 mL×2
2	One Step Depolluting Probe 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。

## 03/产品概述

本试剂盒专为以 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, 使用基因特异性引物 (GSP), 逆转录和 qPCR 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, 并降低了污染风险。本试剂盒中引入了 dUTP/UDG 防污染系统。热敏感 (Heat-labile) UDG 在室温下即可将含 U 的污染物迅速降解; 55℃逆转录时, Heat-labile UDG 迅速失

活，不会影响 RT-qPCR 的效率和灵敏度。2×One Step Depolluting Probe Mix 包含优化的缓冲体系和 dUTP/UDG Mix，适用于 Taqman 等荧光标记探针的高特异性检测系统。One Step Depolluting Probe Enzyme Mix 整合比例优化的 SPARKscript II H<sup>-</sup> 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，检测灵敏度可达到 0.1 pg 总 RNA 或 <10 拷贝的 RNA 模板。

## 04/质量控制

所有组分经检测均无核酸内切酶、核酸外切酶及 RNase 残留。

功能测试：以 HeLa 细胞总 RNA 为模板，1 pg-1 μg 起始量中的 4 个浓度梯度，扩增三个不同丰度基因。扩增效率在 0.9-1.1 之间，且模板量为 1 pg 时 B2M 基因的 CT 值在 35 以内。

## 05/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需要加 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。
- ◇ One Step Depolluting Probe 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。
- ◇ 建议 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。
- ◇ 请冰上融化后，轻轻上下颠倒，混合均匀，避免起泡，并瞬时离心后使用。

## 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 Depolluting Probe Mix	5 μL	10 μL	1×
One Step Depolluting Probe 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
TaqMan Probe (10 μM)	0.1 μL	0.2 μL	0.1 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 μM 范围内调整引物浓度。
- 2) 探针终浓度可在 50-250 nM 之间调整。
- 3) 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影响。推荐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。
- 4) 扩增产物长度请选择在 80-200 bp 范围内。

2. 按下列条件进行 One Step qRT-PCR 反应:

标准程序 (可获得最高的扩展灵敏度)

Stage	操作	Reps	温度	时间
Stage 1	逆转录	1	55°C	15 min
Stage 2	预变性	1	95°C	30 sec
Stage 3	循环反应	45	95°C	10 sec
			60°C	34 sec*1

快速程序 (可满足大部分应用)

Stage	操作	Reps	温度	时间
Stage 1	逆转录	1	55°C	5 min
Stage 2	预变性	1	95°C	30 sec
Stage 3	循环反应	45	95°C	5 sec
			60°C	20 sec*2

1. 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 7500 时至少 34 sec。2. 实际使用的 Real Time PCR 仪是否支持快速扩增循环, 初次尝试请进行预实验确认。

3. 反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线, 进行标准曲线制作等。

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 Depolluting Probe Mix	5 μL	10 μL	1×
One Step Depolluting Probe 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
TaqMan Probe (10 μM)	0.1 μL	0.2 μL	0.1 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 μM 范围内调整引物浓度。
- 2) 探针终浓度可在 50-250 nM 之间调整。
- 3) 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影响。推荐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。

4) 扩增产物长度请选择在 80-200 bp 范围内。

2. 按下列条件进行 One Step qRT-PCR 反应:

标准程序 (可获得最高的扩展灵敏度)

Stage 1	逆转录	Reps: 1	55°C	15 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95°C	30 sec
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95°C	10 sec
			60°C	30 sec*1

快速程序 (可满足大部分应用)

Stage 1	逆转录	Reps: 1	55°C	5 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95°C	30 sec
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95°C	5 sec
			60°C	20 sec*2

1. 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。

2. 实际使用的 Real Time PCR 仪是否支持快速扩增循环, 初次尝试请进行预实验确认。

3. 反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线, 进行标准曲线制作等。

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 Depolluting Probe Mix	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	1 $\times$
One Step Depolluting Probe 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
TaqMan Probe (10 $\mu$ M)	0.1 $\mu$ L	0.2 $\mu$ L	0.1 $\mu$ 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  $\mu$ M 范围内调整引物浓度。

2) 探针终浓度可在 50-250 nM 之间调整。

3) 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影响。推荐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。

4) 扩增产物长度请选择在 80-200 bp 范围内。

2. 按下列条件进行 One Step qRT-PCR 反应:

标准程序 (可获得最高的扩展灵敏度)

Stage 1	逆转录	Reps: 1	55°C	15 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95°C	30 sec
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95°C 60°C	10 sec 30 sec*1

快速程序 (可满足大部分应用)

Stage 1	逆转录	Reps: 1	55°C	5 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95°C	30 sec
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95°C 60°C	5 sec 20 sec*2

1. 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。

2. 实际使用的 Real Time PCR 仪是否支持快速扩增循环, 初次尝试请进行预实验确认。

3. 反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线, 进行标准曲线制作等。

## 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)

