**Green One StepqRT-PCR Pre-Mix**

**■ 制品说明：**

SYBR Green One Step qRT-PCR Pre-Mix是具有高灵敏度、高效合成能力和高扩增效率的一步法qRT-PCR试剂盒。本试剂盒以RNA为模板，反向基因特异引物为反转录引物合成cDNA；然后以合成的cDNA为模板，正向、反向基因特异引物进行qPCR，在同一反应体系中一步完成从反转录到qPCR的全部反应。

**■产品内容**：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **产品组成** | **包装规格** | |
| **KTSM2405** | **KTSM2406** |
| 2×SYBR Green One StepqRT-PCR Pre-Mix | 2×1.25 ml（100 Texts×50 μl） | 5×2.5 ml（500 Texts×50 μl） |

**■保存**：

-20 ℃避光保存1年。

**■使用方法**：

1.qPCR反应体系配制

（1）以25 μl总反应体积为例准备反应体系。如果反应体积有变化，按比例调整用量。

|  |  |
| --- | --- |
| **产品组成** | **包装规格** |
| 2×SYBR Green One StepqRT-PCR Pre-Mix | 12.5 μl |
| 正向引物（10 μM） | 0.5 μl |
| 反向引物（10 μM） | 0.5 μl |
| 样本模板 | 1pg-1μg |
| ddH2O | Variable |
| 总体积 | 25 μl |

注：引物终浓度应在0.1-0.6 μM之间进行调节。一般情况下，终浓度为0.2 μM的引物可以得到较好的结果。

（2）各组分添加完之后，轻柔混匀反应液。如果产生气泡，低速离心以除去气泡。

2. qPCR反应条件设置

（1）三步法热循环流程图

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 | 检测荧光 |
| 逆转录 | 50℃ | 15 min | 1 | Off |
| 预变性 | 95℃ | 2 min | 1 | Off |
| 变性 | 95℃ | 10s | 40 | Off |
| 退火 | 60℃ | 20s | On |
| 延伸 | 72℃ | 15s | On |

（2）两步法热循环流程图

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 | 检测荧光 |
| 逆转录 | 50℃ | 15 min | 1 | Off |
| 预变性 | 95℃ | 2 min | 1 | Off |
| 变性 | 95℃ | 10s | 40 | Off |
| 退火 | 60℃ | 20-30s | On |

**注：对于ABI仪器，荧光信号采集步骤（三步法中可以是退火或是延伸步骤）**

**高扩增效率选择三步法。高特异性选择两步法。**

3.熔解曲线分析

基于SYBR Green I嵌合荧光染料的定量PCR在扩增结束后可以做熔解曲线分析，检查是否非特异性扩增或者引物二聚体。请参照所用qPCR仪的说明进行熔解曲线分析。

**注意事项**

**1. 避免RNase污染**

**2. 为保证反应成功，请使用高质量的RNA模板**