

**BioRT Real Time RT-PCR Kit
(SYBR Green)**

**BioRT 实时荧光 RT-PCR 试剂盒
(SYBR Green) 说明书**

TECHNICAL SUPPORT:

For technical support, please dial phone number : 0086-571-87774567-5215 or 5211, or fax to
0086-571-87774553

Email to reagent@bioer.com.cn.

Website: www.bioer.com.cn

产品说明

本试剂盒是一种一步法实时 RT-PCR 扩增试剂,在同一反应体系中连续进行逆转录(RT)和 PCR 反应,用户使用时只需加入合适的引物和 RNA 模板就可轻松进行荧光定量 RT-PCR 反应和融解曲线分析。

本试剂盒采用一步法进行,反应过程中无需打开管盖,避免了交叉污染,同时具有高特异性,高灵敏,使用方便等特点。

试剂盒组成

货号	BSB33S1	BSB33M1
试剂盒组成	50 人份	100 人份
RT-PCR Mix (SYBR Green)	750 ul	750 ul×2
Enhancer	75 ul	150 ul

保存: -20℃

实验操作

1、按以下条件配制反应液

RT-PCR Mix (SYBR Green)	15 μl
Enhancer	1.5 μl
上游引物 (5μM)	0.5ul
下游引物 (5μM)	0.5ul
实验样品 RNA	X μl
RNase free H ₂ O	12.5 - X μl

总体积

30 μl

2、实验样品标准反应条件：

90 °C	30 s	
60 °C	30 min	
94 °C	1 min	
94 °C	30 s	} 45 cycles
60 °C	30 s	
72 °C	1 min	

荧光信号采集设在 72°C (每循环第三步反应时)。

注：退火温度可以根据引物的退火温度来调整。

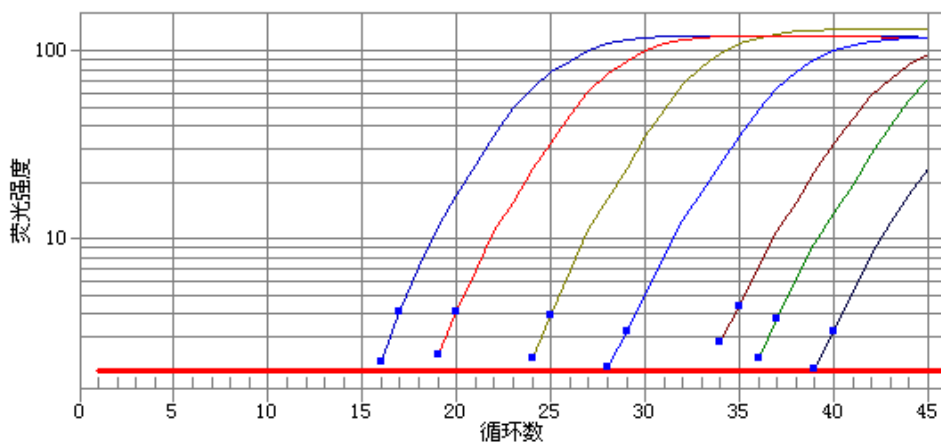
使用 Line-gene 系列荧光定量 PCR 检测系统, 在运行之前, 设置增益调节, 调节增益使荧光本底值在 5-15, 也可根据试剂的实际情况调整; 仪器检测通道选择设定为 F1 (SYBR Green I) 通道。

融解度曲线程序设置如下:

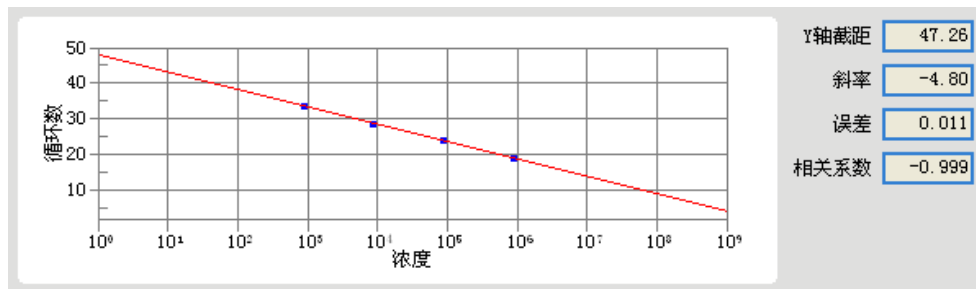
- 95°C, 1min;
- 65°C, 1min;
- 95°C, 20s, 步进 0.5°C/s;
- 30°C, 1min。

案例

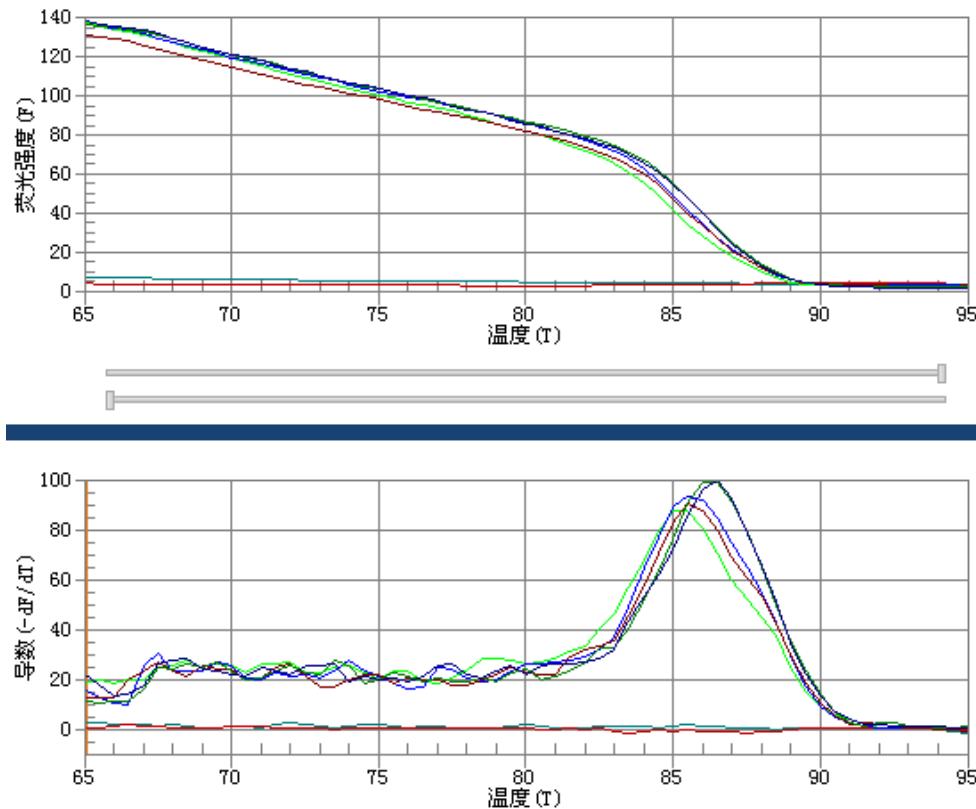
图一：检测小鼠总 RNA 梯度 (270ng、90ng、9ng、0.9ng、0.09ng、0.03ng、0.01ng 和阴性) 中的 GAPDH 基因荧光定量曲线。



图二：小鼠总RNA梯度绘制标准曲线。



图三：小鼠总RNA梯度融解曲线。



使用提示

- 1 适用于所有 RNA 模板，建议使用高质量 RNA；
- 2 引物探针设计的好坏直接影响到 RT-PCR 反应的结果，设计引物考虑多种因素，如 GC 含量，引物长度，引物位置等因素，因此我们建议采用优秀的引物设计软件来设计，如 Primer Premier 5.0 等；当阴性对照有引物二聚体产生时，可适当降低引物用量。
- 3 一步法 RT-PCR 实验应避免 RNase 污染，可采用以下措施：

- 1) 因人的皮肤表面和唾液都有 RNase，因此实验中应戴一次性手套和口罩；
- 2) 一步法 RT-PCR 实验应使用专门的仪器和耗材，建议在专门区域操作 RNA；
- 3) 一步法 RT-PCR 实验相关耗材应使用干热灭菌（180℃，2 小时）或用 0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在 37℃处理 12 小时后在 121℃高压灭菌 30 分钟；
- 4 RT-PCR Mix (SYBR Green) 在取用之前应离心后再吸取，并缓慢吸取，使用后应尽快放回 -20℃。
- 5 加 RNA 模板后需要吹打混匀，上机时避免有挂滴和气泡。

参考文献

1. Houts, G.E., Miyagi, M., Ellis, C., Beard, D., and Beard, J.W. (1979) *J. Virol.* 29(2):517-522.
2. Guide to Molecular Cloning Techniques. *Methods in Enzymology*, Volume 152. pp 316-325. Edited by Shelby Berger and Alan R. Kimmel. Academic Press, Inc.
3. Aatsinki JT, Lakkakorpi JT, Pietila EM, Rajaniemi HJ. *Biotechniques*. 1994 ;16(2):282-4, 286-8.
4. F. X. LIMBACH, B. JAULHAC, Y. PIE´ MONT, J. L. KUNTZ, H. MONTEIL, AND J. SIBILIA. *J Clin Microbiol.* 1999. 2037-2039.