

AllStart[®] One Step RT-qPCR SYBR Green Kit

染料法一步 RT-qPCR 预混液 (适配体热启动)

R305

Version 23.1.1



产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

目录 Product Manual

产品简介	1
产品特点	1
产品组成	1
产品应用	2
储存条件	2
实验方案	2
注意事项	3
实验案例	4

产品简介

AllStart® One Step RT-qPCR SYBR Green Kit (ATG #R305) 基于 SYBR Green I 嵌合荧光法, 针对以 RNA 为模板 (如 RNA 类病毒) 的荧光定量 PCR 快速检测设计, 结合使用基因特异性引物, 可使逆转录和 qPCR 反应在一管内完成, 无需额外操作, 降低污染的风险同时, 也极大提升了检测通量, 更适于定量检测基因数目少而样本数量类型多的实验场景。产品基于适配体修饰热启动 AllStart® Taq DNA Polymerase (ATG #P303) 优越性能开发, 且配以耐高温逆转录酶 ATGScript® M-MLV (H-) Reverse Transcriptase II (ATG #R111) 和精细优化的反应缓冲体系, 是一步快速定量检测 RNA 绝佳方案, 对于含二级结构、长片段和高 GC 等复杂 RNA 模板可将反转录步骤温度提升至 60~72°C, RNA 检测灵敏度可达到 0.1 pg 或 10 copies/test。

产品特点

快速便捷的定量检测

- ❖ 基于应用场景开发模块简化型方案;
- ❖ 方便的预混液型试剂, 用户友好型的产品设计

一流卓越的产品性能

- ❖ 基于耐高温逆转录酶和优越性能热启动 Taq 共同开发;
- ❖ 均经严格测试, 具备优秀的特异性、灵敏度、准确性和可重复性;
- ❖ 通过性能综合对比评估表现出超越市面竞品的卓越性能

产品组成

组分	R305 (250 rxns) (20 µl/rxn)
2 × AllStart® SYBR One Step Reaction Mix ^a	2 × 1.25 ml
AllStart® RTq Enzyme Mix ^b	250 µl
50 × ROX Reference Dye 1 ^c	100 µl
50 × ROX Reference Dye 2 ^c	100 µl
RNase-free ddH ₂ O	2 × 1.25 ml

a. 包含 dNTP Mix, Mg²⁺特异性增强因子, SYBR Green I。

b. 包含 M-MLV (H-) Reverse Transcriptase II (ATG #R111)、RNasin (ATG #RR101)以及 AllStart® Taq DNA Polymerase (ATG #P303)。

c. 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差, ROX Reference Dye 1 适用机型有: Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; Step One, Step One Plus。ROX Reference Dye 2 适用机型有: Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA7, QuantStudio 3, 5, 6Flex, 7Flex, 2K Flex; Stratagene MX4000, MX3005P, MX3000P。无需加 ROX 染料的机型有: Bio-Rad CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ5, MyiQ, MiniOpticon, Opticon, Optico 2, Chromo4; Cepheid SmartCycler; Eppendorf Mastercycler ep realplex, realplex 2s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Roche Applied Science LightCycler 480, 2.0, 96; Thermo Scientific PikoReal Cycler; Takara Thermal Cycle Dice Real Time System TP700, TP800, TP850, TP900, TP950; Monad q225, q225MX; 宏石

产品应用

动植物、微生物等多样本基因表达分析；
RNA 病毒核酸样本快速检测

储存条件

-20℃ 避光保存，于-20~0℃运输。▲避免反复冻融。

实验方案

1. 体系配制 (以 ABI StepOne Plus 为测试机型)

组分	用量
2 × AllStart® SYBR One Step Reaction Mix	10 μl
AllStart® RTq Enzyme Mix	1 μl
50 × ROX Reference Dye 1	0.4 μl (可选)
Gene Specific Primer Forward (10 μM)	0.4 μl
Gene Specific Primer Reverse (10 μM)	0.4 μl
Template RNA	1 pg ~ 1 μg
RNase-free ddH ₂ O	to 20 μl

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

- ❖ 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。
- ❖ 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（如稀释至 2 - 5 μl/样本）加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。
- ❖ 扩增产物长度请选择在 100 - 500 bp 范围内，尤其推荐 100 - 200 bp 之内。

2. 程序设置

步骤	温度	时间	阶段	循环数
逆转录	50°C ^a	5 min ^b	Stage 1	Rep: 1
预变性	95°C	30 sec	Stage 2	Rep: 1
变性	95°C	10 sec	Stage 3	Reps: 40
退火延伸 ^c	60°C	30 sec		
溶解曲线 ^d	95°C	15 sec	Stage 4	Rep: 1
	60°C	60 sec		
	95°C	15 sec		

- 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 ~ 65°C，有助于提高扩增效率和灵敏度，内含逆转录酶可耐受 72°C 高温。
- 逆转录时间可延长至 15 min，有助于提高 cDNA 产量。
- 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 7500 时至少 34 sec。
- 仪器类型不同，溶解曲线采集程序不尽相同，建议使用仪器默认溶解曲线采集程序即可。

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

注意事项

- 由于试剂方案涉及 RNA，请注意控制 RNase 污染，建议佩戴洁净手套口罩，使用 RNase-free 枪头、离心管等。
- 建议使用低吸附枪头，避免移液残留，减少移液误差。

实验案例

灵敏度极高

在相同反应条件下，使用 ATG #R305 和竞品 V 产品对 10 ng 小麦 RNA 模板进行检测，比较扩增灵敏度差异，结果表明同一反应程序下 ATG #R305 的扩增性能明显优于竞品，相比竞品 2.95 个循环数检出，且平台期荧光强度高，空白对照控制良好 (Fig. 1)。

灵敏度测试	重复 1	重复 2	重复 3	均值	极差	空白
竞品 V	18.78	18.72	18.46	18.65	0.32	25.88
ATG #R305	15.85	15.63	15.70	15.70	0.22	NoCt
$\Delta Ct = (R305-V)$				-2.95		

扩增曲线
<p>Fig. 1 R305 对比竞品灵敏度测试结果</p>

模板兼容性好

使用 ATG #R305 和竞品试剂对比测试模板兼容性，模板样本类型包括病毒 PRRSV RNA、鼠 RNA、小麦 RNA，ATG #R305 在动物、植物以及病原体样本中均可以用于 RNA 的扩增反应，且在样本为动植物时扩增效果明显优于竞品，相比竞品快 2-5 个循环数检出，样本类型为病毒时扩增效果与竞品相当 (Fig. 2)。

模板兼容性测试		PRRSV RNA	鼠 RNA	小麦 RNA
竞品 V	重复 1	11.41	24.37	28.44
	空白	NoCt	NoCt	NoCt
ATG #R305	重复 1	12.31	22.06	23.42
	重复 2	12.20	21.48	23.60
	均值	12.26	21.77	23.51
	空白	NoCt	NoCt	NoCt
$\Delta Ct = (R305-V)$		0.79	-2.6	-4.93

扩增曲线
<p>Fig. 2 R305 对比竞品模板兼容性测试结果</p>



025-85653525

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室