



# M-MLV III Green One-Step qRT-PCR Kit

## 产品信息:

组成	MT612-01 20 $\mu$ l $\times$ 100 rxns	MT612-02 20 $\mu$ l $\times$ 500 rxns
2 $\times$ Green One-Step qRT-PCR Mix	1ml $\times$ 1	1ml $\times$ 5
H <sub>2</sub> O(RNase free)	1ml $\times$ 2	1ml $\times$ 6

## 保存:

-20 $^{\circ}$ C保存, 避免反复冻融。

## 产品描述:

该产品为2 $\times$ 预混液, 将缓冲液与反转录酶, 热启动DNA聚合酶按照最优的比例预混, 确保了快速、高特异性和超灵敏的一步RT-qPCR。在同一管中进行反转录与荧光定量PCR, 使用方便, 仅需加入引物与模板, 用H<sub>2</sub>O(RNase free)补足体系即可。

## PCR Reaction Conditions(for a 20 $\mu$ l reaction)

2 $\times$ Green One-Step qRT-PCR Mix	10 $\mu$ l
10 $\mu$ M Forward Primer	0.4 $\mu$ l *1
10 $\mu$ M Reverse Primer	0.4 $\mu$ l *1
Template	as required
H <sub>2</sub> O(RNase free)	up to 20 $\mu$ l

\*1: 引物终浓度可在0.1-1 $\mu$ M范围调整。

## PCR cycling conditions:

以下RT-qPCR条件适用于大部分仪器。但是, 对于特定仪器可以按照仪器说明改变循环条件。M-MLV III Green One-Step qRT-PCR Kit兼容三步循环或两步循环:

### 3-step cycling:

Step	Temp	Time	Cycles
Reverse transcription	45-50 $^{\circ}$ C	5-10min	1
Polymerase activation	95 $^{\circ}$ C	30sec	1
Denaturation	95 $^{\circ}$ C	5-10sec	40
Annealing	60 $^{\circ}$ C	30sec	
Extension	72 $^{\circ}$ C	5-20sec	

### 2-step cycling:

Step	Temp	Time	Cycles
Reverse transcription	45-50 $^{\circ}$ C	5-10min	1
Polymerase activation	95 $^{\circ}$ C	30sec	1
Denaturation	95 $^{\circ}$ C	5-10sec	40
Annealing/ Extension	60-65 $^{\circ}$ C	20-30sec	

可参考仪器说明书选择熔解曲线进行分析。

以上条件仅供参考;条件因反应而异,可能需要优化。

#### 建议和优化:

引物:引物的序列、浓度以及扩增子的长度对任何RT-qPCR的特异性扩增、产量和总效率都至关重要。我们强烈建议您在设计和运行RT-qPCR时考虑以下几点:

- 使用Primer3设计软件,如Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)或visual OMP™ (<http://dnasoftware.com/>)。引物的熔解温度(T<sub>m</sub>)应在60°C左右
- 最佳扩增子长度为80-200bp,不超过400bp
- 最终引物浓度400nM适用于大多数SYBR-Green的反应,但为了确定最佳浓度,我们建议使用范围为0.1-1μM
- 使用等摩尔浓度的引物
- 尽可能使用跨越内含子的引物以避免基因组DNA的扩增
- 模板:重要的是, RNA模板是完整的,没有DNA污染或污染抑制剂。

RT-PCR对照:检测可能影响数据可靠性的污染DNA的存在是很重要的。

可选ROX:该试剂盒不含 ROX(5-羧基-罗丹明,琥珀酰酯),因此,如果您的仪器需要ROX,可从本公司单独购买。

#### 仪器的兼容性:

对于使用SYBR Green荧光染料的仪器, M-MLV III Green One-Step qRT-PCR Kit 已经过优化。

这个试剂盒除了无需 ROX校正的仪器,同样适合需要ROX的仪器,但ROX需单独购买。

BM20210707