

版本号: FP151203

Quant One Step RT-qPCR Kit (Probe)

Quant一步法反转录-荧光定量试剂盒

(探针法)

目录号: FP304

产品内容

产品组成	FP304-01 50 μ l \times 50 rxn
2 \times Quant One Step Probe RT-qPCR Master Mix [†]	1.3 ml
Hotmaster Taq Polymerase (2.5 U/ μ l)	130 μ l
Quant RTase (for one step)	40 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	2 \times 1 ml

[†] 内含dNTP Mixture、One step Probe RT- qPCR buffer、和ROX Reference Dye等。

储存条件

请将该试剂盒（含有ROX内参染料）置于-20 $^{\circ}$ C避光保存。

适用的Real Time PCR扩增仪

ABI PRISM 7000/7700/7900HT, 7300/7500 Real-Time PCR System, 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

OPTICON[™] / CFX96 (BIORAD)

Light Cycler480 (Roche)

Smart Cycler[®] System (Cepheid)

Mx3000 P/Mx3005P (Stratagene)

Line-Gene (Bioer, 杭州博日)

其他各种Real Time PCR扩增仪

产品简介

本制品是采用探针法（TaqMan[®]，Molecular Beacon等）进行一步法RT-qPCR的专用试剂。使用本制品进行Real Time One Step RT-qPCR反应可在同一反应管内连续进行，操作简单，并能有效防止污染。本反应体系由于可以对扩增产物进行实时检测，大大提高了检测灵敏度，并省略了PCR反应后的电泳步骤，非常适合于微量RNA的检测。

本制品中使用了最适合于Real Time RT-qPCR的反转录酶Quant RTase和Hotmaster Taq DNA polymerase，保证了Real Time One Step RT-qPCR能稳定、高效的进行。Quant RTase是一种由工程菌进行重组表达的全新高效逆转录酶，具有与RNA高亲和性的特点，其能通读GC含量高、二级结构复杂的RNA模板，而Hotmaster Taq DNA Polymerase利用抑制剂通过温度调节方式封闭Hotmaster Taq DNA Polymerase的底物结合位点，温度低于40°C时，形成非活性的酶-抑制剂复合物，当温度升高至引物特异性的退火温度时，结合平衡向模板-特异性引物复合物形成方向移动，因此最大限度的减少PCR扩增全程中的非特异性扩增产物产生，大大提高了荧光定量PCR反应的精确性。

本制品可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对多种高低丰度的靶基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。

产品特点

1. 一步完成Real Time RT-qPCR反应，快速、准确地对RNA病毒等微量RNA进行分析。
2. PCR使用了改良后的HotMaster Taq Polymerase，可以进行Hot Start法PCR反应，再与TIANGEN公司独自开发的Buffer系统相结合，具有高扩增效率，高扩增灵敏度，高扩增特异性之特点。
3. 2×Quant One Step Probe RT-qPCR Master Mix中预先混有One Step Probe RT-qPCR buffer、dNTP和ROX Reference Dye等，反应液配制十分简单方便，最大限度的减少了操作中的污染。

用户自备

1. 引物及探针
 2. 模板
 3. 分子生物学实验级别的水（无核酸酶）
 4. 一次性手套及其它耗材
-

注意事项

- 1) 当同时需要进行数次Real Time One Step RT-qPCR反应时，应先配制各种试剂的混合液（其中包括2×One Step Probe RT-qPCR Master Mix、RNase-free ddH₂O、Hotmaster Taq polymerase、Quant RTase、Primers、Probe等），然后再分装到每个反应管中。这样可使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失，避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作或实验样品之间产生的误差。
- 2) 使用2×One Step Probe RT-qPCR Master Mix时，应轻轻混匀，避免起泡，并在分取时慢慢吸取。
- 3) 保存2×Quant One Step Probe RT-qPCR Master Mix 或配制Real Time One Step RT-qPCR反应液时应避免强光照射。
- 4) 反应液的配制、分装时请一定使用新的（无污染的）枪头或带滤芯枪头、Microtube等，尽量避免污染。
- 5) 制品只能使用特异性反转录引物，不能使用Random Primer和Oligo dT Primer等进行反转录反应。

操作步骤

- 1) 按下列组份配制RT-qPCR反应液（反应液配制请在冰上进行）

组成成分	50 μl 体系	终浓度
2×Quant One Step Probe RT-qPCR Master Mix	25 μl	1×
HotMaster Taq Polymerase (2.5 U/μl)	2 μl	
Quant RTase (for one step)	0.7 μl	
正向引物	-	0.25 μM ¹
反向引物	-	0.25 μM ¹
探针	-	0.20 μM ²
RNA 模板 ³	-	-ng-pg
RNase-Free ddH ₂ O	至50 μl	-

¹ 通常引物终浓度为0.25 μM可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1-1.0 μM 范围内调整引物浓度。

² 通常探针终浓度为0.20 μM可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在0.1-0.5 μM范围内调整探针浓度。

³ 建议在反应液中使用10 pg~100 ng的Total RNA为模板。

2) 进行Real Time One Step RT-qPCR反应

PCR反应管用离心机瞬时离心后放入荧光定量PCR仪中进行Real Time PCR反应。建议采用下列图表显示的标准PCR反应程序，如果使用该程序得不到良好的实验结果时，再进行PCR条件的优化。

反应步骤（建议）

循环	步骤	温度	时间	内容
1 ×	1	50	30 min	反转录
1 ×	2	92°C	3 min	起始模板变性
(可选步骤) ^{**1} 4 × (touch down)	3	92°C	10 sec	变性
	4	45-55°C	30 sec	退火
	5	68°C	1 min	延伸
35-45 ×	6	92°C	10 sec	PCR循环中模板变性
	7	50-60°C	20 sec	退火
	8	68°C	20 sec	延伸

^{**1}建议在RNA模板量少或目的基因表达量较低时选用此步骤。其可有效募集PCR模板。

3) 实验结果分析

反应结束后确认Real Time One Step RT-qPCR的扩增曲线，进行RT-qPCR定量时制作标准曲线等。
