

BrightFISH® Universal One Step RT-qPCR Mix

(通用一步法RT-qPCR预混液)

使用说明书 (Ver.0.0.2)

产品描述

- ◇ 更灵敏更高效的探针法 RT-qPCR 试剂盒

产品货号:

JSR-E-602-50 (50 次反应) JSR-E-602-200 (200 次反应)



扫描二维码了解更多产品信息

目录 Contents

产品组份	1
储存条件	1
适用的 Real Time PCR 扩增仪	1
产品简介	1
产品特性	2
适用范围	2
操作步骤	2
注意事项	3

产品组份

试剂盒组成	50 次	200 次
2×One Step Probe RT-qPCR Buffer	1.25 ml	4×1.25 ml
25×RT-qPCR Enzyme Mix	100 μl	400 μl
50xROX Reference Dye (选配)	250 μl	1 ml
RNase-Free Water	2×1 ml	5×1 ml

*本试剂盒中不提供 50xROX Reference Dye，如有需要请单独购买

储存条件

请将该试剂盒置于-30~-15°C保存，保质期 1 年。

适用的Real Time PCR扩增仪

PRISM 7000/7700/7900HT, 7300/7500 Real-Time PCR System, 7500 Fast Real-Time PCR System, ViiA 7(Applied Biosystems)

OPTICON™, CFX96 (BIORAD)

Light Cycler 480 (Roche)

Smart Cycler® System (Cepheid)

Mx3000 P/Mx3005P (Stratagene)

其他各种 Real Time PCR 扩增仪

产品简介

本产品是采用探针法 (TaqMan®, Molecular Beacon 等) 进行一步法 RT-qPCR 的专用试剂。使用本产品进行 Real Time One Step RT-qPCR 反应可在同一反应管内连续进行，操作简单，避免了样品间交叉污染的同时也提高了检测的灵敏度。

本试剂盒中的 25xRT-qPCR Enzyme Mix 为简石逆转录酶 (JSR-E-501)、抗体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶 (JSR-E-201) 及 RNase Inhibitor 的预混 Mix 形式，其中的简石逆转录酶 (JSR-E-501) 是分子改造后的新型逆转录酶，具有更强的 RNA 亲和性和热稳定性，提高了该酶的逆转录效率和对具有复杂二级结构 RNA 模板的延伸能力；PCR 过程中采用了性能优良的新型热启动 Taq DNA 聚合酶，使得逆转录后的 PCR 反应具有更高的扩增效率和特异性。另外，本产品中的 2xOne Step Probe RT-qPCR Buffer 是专门为上述两种关键酶而优化的新型反应体系，其中包含必要离子组分、dNTPs 以及 PCR 稳定剂和增强剂，可保证简石逆转录酶 (JSR-E-501)、抗体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶 (JSR-E-201) 在整个一步法反应过程中发挥优良功效。

本产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。

产品特性

- ◇ 反应灵敏高效：性能优良的逆转录酶和 Taq 酶保证了高反应效率；
- ◇ 操作简单快速：双组分的产品形成使得操作过程变得简单快速；
- ◇ 解决复杂模板：通读 GC 含量高，二级结构复杂的 RNA 模板；
- ◇ 样本普适性好：对不同物种来源及杂质较多的 RNA 模板的适用性高。

适用范围

1. RT-qPCR 技术可用于检测样本中目的基因表达水平及 RNA 病毒的含量。

操作步骤

1. 完全融化模板 RNA，特异性引物，2xOne Step Probe RT-qPCR Buffer，25xRT-qPCR Enzyme Mix，50xROX Reference Dye 和 RNase-Free ddH₂O，短暂离心后置于冰浴上。
2. 按下表在冰浴条件下配制反应液：

试剂盒组成	体积/反应
2×One Step Probe RT-qPCR Buffer	25 μl
25×RT-qPCR Enzyme Mix	2 μl
上游特异性引物 (10μM)	1.25 μl
下游特异性引物 (10μM)	1.25 μl
探针 (10μM)	1 μl
RNA 模板	10pg-1μg total RNA
50xROX Reference Dye	
RNase-Free Water	补水至 50 μl
总体系	50 μl

*引物终浓度为 0.25μM 可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效果不高时，可增加 PCR 反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少 PCR 反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的，可以在 0.05-0.90μM 范围内调整。

*探针的浓度与使用的 Real-Time PCR 扩增仪，探针种类，荧光标记物质种类有关，实际使用请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用说明进行。通常探针终浓度为 0.2μM 可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。需要进一步优化探针浓度的，可以在 0.1-0.5μM 范围内调整。

*几种常见仪器的匹配 ROX Reference Dye 浓度见下表：

仪器	终浓度
ABI 7000/7300/7700/7900/7900HT/7900HT Fast, StepOne™/ StepOne Plus™	5× (例如：5 μl ROX / 50 μl 体系)
ABI 7500/7500 Fast, ViiA 7, QuantStudio™3/5/6 Flex/7 Flex/12K Flex; Applied Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000	1× (例如：1 μl ROX / 50 μl 体系)
Roche 仪器, Bio-Rad 仪器, Eppendorf 仪器等	不用添加

3. 进行 Real Time One Step RT-qPCR 反应

PCR 反应管请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，如果使用该程序得到不良的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化。

反应步骤 (建议)

反应温度	反应时间	反应循环数	说明
42°C	30 min	1	逆转录
95°C	3 min	1	预变性
95°C	30 sec	40	PCR 循环步骤， 请在该步骤收集荧光
60°C	30 sec		

4. 实验结果分析

反应结束后确认 Real Time One Step RT-qPCR 的扩增曲线，CT 值，标准曲线等，并进行 RT-qPCR 定量结果分析。

注意事项

- RNA 模板可以采用总 RNA 或 Mrna,建议使用简石生物公司生产的 TR121 或 TB210 系列制备高质量的总 RNA。
- 一步法 RT-qPCR 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，因此实验中应佩戴一次性手套和口罩；
 - 2) 一步法 RT-qPCR 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-qPCR 实验相关耗材应用 0.1%DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液在 37°C处理 12h，并高压灭菌 30min 后使用。
- 25xRT-qPCR Enzyme Mix 在取用之前应短暂离心收集溶液后再吸取，吸取时动作要慢，使用后应尽快放回-30~-15°C。
- 2xOne Step Probe RT-qPCR Mix 在取用前应充分混匀并离心后使用。
- 本试剂盒必须使用特异性引物，引物可根据具体实验来选择。