

2×One Step Probe RT-PCR Mix 说明书

产品组成

Cat. No.	7406100	7406500
2×One Step Probe RT-PCR Mix* ¹	1 ml	1 ml×5
RT-Taq 酶混合液* ²	80 μl	400 μl
50×ROX Reference Dye* ³	40 μl	200 μl
RNase-free Water	1 ml	1 ml×5
说明书	1 份	1 份

*1 包含dNTP Mix, Mg²⁺等。

*2 包含反转录酶、Taq酶、Taq酶抗体和RNase Inhibitor等。

*3 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

产品储存与有效期

- 20℃避光保存有效期为两年以上。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn，电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品是采用探针法进行Real Time One Step RT-PCR的专用试剂。使用本产品进行Real Time RT-PCR反应可在同一反应管内连续进行反转录和PCR扩增，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监测，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RNA病毒的检测。

本产品使用了高效反转录酶和高特异性的热启动Taq DNA聚合酶，能进行稳定高效的Real Time One Step RT-PCR反应。针对以ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪，本产品还特别配有ROX染料，用以校正定量PCR仪孔与孔之间产生的荧光信号误差。

用户需自备的试剂和物品

1. PCR 引物、探针。
2. RNA 模板。
3. 适用于荧光定量 PCR 的单管、8 联排管、或 96 孔 PCR 管(板)。
4. 微量移液器和带滤芯的洁净吸头。
5. Real Time PCR 扩增仪（授权仪器）。

注意事项

1. 当同时需要进行数次 Real Time One Step Probe RT-PCR 反应时，应先配制各种试剂的混合液（Master Mix；其中包括 RNase-free Water、Buffer、酶等），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 RT-Taq 酶混合液时，应轻轻混匀，避免起泡；分取之前要小心地离心收集到反应管底部；由于酶保存液中含有高浓度的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。
3. 反应液的配制、分装时请一定使用新的带滤芯枪头、离心管等，尽量避免污染。
4. 本产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-PCR 反应液（反应液配制请在冰上进行）

试剂	使用量	终浓度
2×One Step Probe RT-PCR Mix	25 μl	1×
RT-TaQ 酶混合液	2 μl	
正向引物（10 μM）*1	1 μl	0.20 μM
反向引物（10 μM）*1	1 μl	0.20 μM
探针（10 μM）*1	1 μl	0.20 μM
50×ROX Reference Dye*2	1 μl	
RNA 模板*3	—	
RNase Free Water	至 50 μl*4	

*1 通常引物和探针的终浓度为 0.2 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 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。使用 Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; Applied Biosystems StepOne™, StepOnePlus™等其他需要添加高浓度 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪时，50 × ROX Reference Dye 的添加量为 PCR 反应体系的 1/50; Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA™7, Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™等其他需要添加低浓度 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪时，50 × ROX Reference Dye 的添加量为 PCR 反应体系的 1/250; 下列是不需要添加 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪: Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™, Cepheid SmartCycler®, Eppendorf Mastercycler®ep realplex, realplex 2, Illumina Eco qPCR, Qiagen/Corbett Rotor-Gene®Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000, Roche Applied Science LightCycler™ 480, Thermo Scientific PikoReal Cyclers 等。

*3 建议在 50 μl 反应液中使用 20 pg~200 ng 的 Total RNA 为模板。

*4 按不同仪器的要求确定反应体系的体积。

2. 进行 Real Time One Step RT-PCR 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，如果使用该程序得不到良好的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化。

循环	步骤	温度	时间	内容
1×	1	50℃	5 min	反转录
1×	1	95℃	10 sec	变性
40×	3	95℃	5 sec	PCR 反应
	4	60℃	30~35 sec	

3. 实验结果分析

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

分析方法参见仪器的操作手册。