

目录

产品组成	1
产品储存与有效期	1
技术支持	1
用户需自备的试剂和物品	1
产品介绍	2
注意事项	2
产品原理	2
操作方法	
◆应用Applied Bio systems 7300/7500 Real-Time PCR System的操作方法	3
◆应用LightCycler [®] Real Time PCR扩增仪的操作方法	5
◆应用Smart Cycler [®] II System Real Time PCR 扩增仪的操作方法	6
实验条件的选择	7
质量标准	8
常见问题分析	9

产品组成

2×One Step Probe RT-PCR Mix Cat. No.	1ml 7406100	5ml 7406500
2×One Step Probe RT-PCR Mix *1 RT-Taq 酶混合液*2 50×ROX Reference Dye*3 50×ROX Reference Dye II*3 RNase Free ddH ₂ O 说明书	1 ml 50 μl 50 μl 50 μl 1 ml 1 份	1 ml×5 250 μl 250 μl 250 μl 1 ml×5 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。

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, 使用50 × ROX Reference Dye; 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, 使用50 × ROX Reference Dye II; 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 Cycler等。

产品储存与有效期

贮存于-20℃, 有效期大于两年。

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。

用户需自备的试剂和物品

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

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，本产品还特别配有不同浓度的 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。

注意事项

1. 使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
 - (1). 请勿涡旋振荡混匀。
 - (2). 由于酶保存液中含有50%的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。
 - (3). 沉淀会导致溶液成分不均匀，使用前务必充分混匀试剂。
2. 保存本产品或配制PCR反应液时应避免强光照射。
3. 尽量减少反复冻融产品的次数，反复冻融可能使产品性能下降。
4. 配制反应液时，请使用洁净的的吸头（推荐使用带滤芯的吸头）和离心管，尽量防止污染。
5. 配制反应液时，试剂请于冰上放置。
6. 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。

产品原理

本系列产品首先使用反转录酶将RNA反转录成cDNA，再以cDNA为模板由Taq DNA聚合酶在同一反应管内连续进行Real Time PCR扩增反应，对探针的荧光信号进行监测。

1. PCR

PCR法是以微量DNA进行目的片段扩增的方法。通过DNA链的热变性、引物退火、Taq DNA聚合酶作用下引物的延伸三个步骤循环往复，可在短时间内扩增DNA达100万倍以上。

本系列产品中的DNA聚合酶采用了比普通Taq酶扩增效率更高的热启动Taq DNA Polymerase，可以在更短时间内进行高灵敏度的检出，并能有效防止在热循环前由引物错配或引物二聚体产生的非特异性扩增。

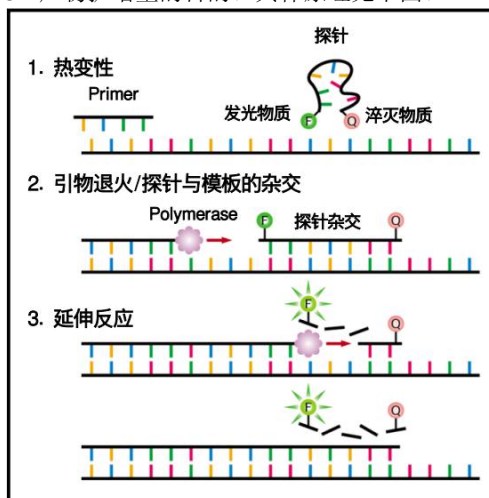
2. RT-PCR

RNA不能作为模板直接用于PCR的扩增，但是可以通过反转录酶以RNA为模板合成cDNA，再经PCR对RNA进行分析，即RT-PCR技术。本试剂盒使用One Step RT-PCR，实验原理如下：先使用特异性引物（反向）对RNA进行反转录，再以合成的cDNA为模板，以特异性引物（正向、反向）进行PCR反应。本产品不能使用随机引物和Oligo dT引物进行反转录反应。

3. 荧光检测法

使用5'端带有荧光物质（如：FAM等），3'端带有淬灭物质（如：TAMRA等）修饰的寡核苷酸进行荧光检测的方法。当探针完整时，5'端的荧光物质受到3'端淬灭物质的制约，不能发出荧光。而当探针被分解后，5'端的荧光物质便会游离出来，发出荧光。

当PCR反应液中加入荧光探针后，在PCR反应的退火过程中，荧光探针便会和模板杂交。进一步在PCR反应的延伸过程中，Taq DNA聚合酶的5'→3' Exonuclease活性可以分解与模板杂交的荧光探针，游离荧光物质发出荧光。通过检测反应体系中的荧光强度，可以达到检测PCR产物扩增量的目的。具体原理见下图。



操作方法

◆ 应用Applied Bio systems 7300/7500 Real-Time PCR System的操作方法

1. 按下列组分配制PCR反应液（反应液配制请在冰上进行）

2×One Step Probe RT-PCR Mix

试剂	使用量	使用量	终浓度
2×One Step Probe RT-PCR Mix	10.0 μl	25.0 μl	1×
RT-Taq酶混合液	0.4 μl	1.0 μl	
PCR Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	1.0 μl	0.2 μM ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl	1.0 μl	0.2 μM ^{*1}
Probe	0.4 μl	1.0 μl ^{*2}	
50× ROX Reference Dye ^{*3}	0.4 μl	1.0 μl	1×
Total RNA	2.0 μl ^{*4}	5.0 μl ^{*4}	
RNase Free ddH ₂ O	6 μl	15.0 μl	
Total	20.0 μl ^{*5}	50.0 μl ^{*5}	

*1 通常引物终浓度为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 探针浓度与所使用的Real Time PCR扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行。

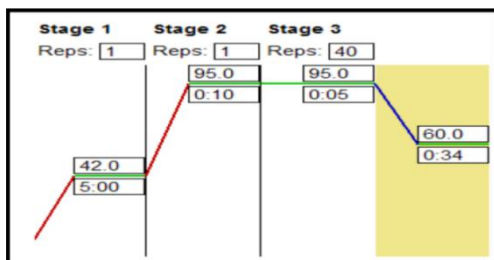
*3 使用7300 Real-Time PCR System时，选用50 × ROX Reference Dye，使用ABI PRISM 7500 Real-Time PCR System时，选用50 × ROX Reference Dye II。

*4 建议在20μl反应液中使用10 pg~100 ng的Total RNA为模板。在50μl反应液中使用20 pg~200 ng的Total RNA为模板。

*5 按照各仪器推荐体系进行反应液配制。

2. 进行Real Time PCR反应

建议采用下列图表显示的两步法PCR反应程序，如果该程序得不到良好的实验结果时，再进行PCR条件的优化。由于使用Tm值较低的引物或两步法PCR反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法PCR扩增反应。有关PCR的具体反应条件请参照「实验条件的选择」。



两步法PCR扩增标准程序：

Stage 1、2：反转录反应

Reps: 1

42°C 5 min

95°C 10 sec

Stage 3：PCR反应

Reps: 40

95°C 5 sec

60°C 31 或 34 sec*

* 使用7300时请设定在31秒；使用7500时请设定在34秒。

◆特别提示:

本产品利用Taq酶抗体使Taq酶具有热启动功能, 与其他公司的化学修饰型Hot Start用Taq酶相比, 不需要PCR反应前的95°C, 5~15分钟酶的活性化反应。如果高温处理时间过长, 会使酶的活性下降, 其PCR的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。PCR反应前的反转录酶的热变性失活通常设定为95°C, 10 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。

◆ 应用LightCycler® Real Time PCR扩增仪的操作方法

1. 按下列组份配制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	10.0 µl	1×
RT-Taq酶混合液	0.4 µl	
PCR Forward Primer (10 µM)	0.4 µl	0.2µM*1
PCR Reverse Primer (10 µM)	0.4 µl	0.2µM*1
Probe	0.4 µl*2	
Total RNA	2.0 µl*3	
RNase Free ddH ₂ O	6.4 µl	
Total	20.0 µl	

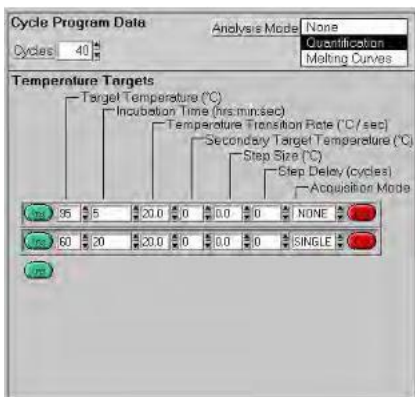
*1 通常引物终浓度为0.2 µM可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在0.1~1.0 µM范围内调整引物浓度。

*2 探针浓度与使用的Real Time PCR扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关, 实际使用时请参照仪器说明书, 或各荧光探针的具体使用要求进行。

*3 建议使用Total RNA模板的量为10 pg~100 ng。

2. 进行Real Time PCR反应

PCR反应用毛细管请用离心机低速离心数秒后放入LightCycler中进行Real Time PCR反应。建议采用下列图表显示的两步法PCR反应程序, 如果该程序得不到良好的实验结果时, 再进行PCR条件的优化。由于使用Tm值较低的引物或两步法PCR反应扩增性能较差时, 可以尝试进行三步法PCR扩增反应。有关PCR的具体反应条件请参照「实验条件的选择」。



标准操作方法:

Stage 1: 反转录反应

1 Cycle

42°C 5 分 20°C/秒

95°C 10 秒 20°C/秒

Stage 2: PCR反应

40 Cycles

95°C 5 秒 20°C/秒

60°C 20 秒 20°C/秒

◆特别提示:

本产品利用Taq酶抗体使Taq酶具有热启动功能, 与其他公司的化学修饰型Hot Start用Taq酶相比, 不需要PCR 反应前的95°C, 5~15分钟酶的活性化反应。如果高温处理时间过长, 会使酶的活性下降, 其PCR的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。PCR反应前的反转录酶的热变性失活通常设定为95°C, 10 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。

◆ 应用Smart Cycler® II System Real Time PCR 扩增仪的操作方法

1. 按下列组分配制 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	12.5 µl	1×
RT-Taq酶混合液	0.5 µl	
PCR Forward Primer (10 µM)	0.5 µl	0.2 µM*1
PCR Reverse Primer (10 µM)	0.5 µl	0.2 µM*1
Probe	0.5 µl*2	
Total RNA	2.0 µl*3	
RNase Free ddH ₂ O	8.5 µl	
Total	25.0 µl	

*1 通常引物终浓度为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 探针浓度与所使用的Real Time PCR扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，使用时请参考仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行。使用Smart Cycler System时，通常探针终浓度在0.1~0.5 μ M范围内进行调整。

*3 建议使用Total RNA模板的量为10 pg~100 ng。

2. 进行Real Time PCR反应

PCR反应管用离心机低速离心数秒后放入PCR仪中进行Real Time PCR反应。建议采用下列图表显示的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。使用Tm值较低的引物或两步法PCR反应扩增性能较差时，可以尝试进行三步法PCR扩增反应。有关PCR的具体反应条件请参照「实验条件的选择」。

Stage 1				
Repeat 1 times.				
2-Temperature Cycle				
Deg/Sec	Temp	Secs	Optics	
NA	42.0	300	Off	
NA	95.0	10	Off	

Advance to Next Stage

Stage 2				
Repeat 40 times.				
2-Temperature Cycle				
Deg/Sec	Temp	Secs	Optics	
NA	95.0	5	Off	
NA	60.0	20	On	

Advance to Next Stage

两步法PCR扩增标准程序：

Stage 1：反转录反应

Repeat: 1 times

42 $^{\circ}$ C 5 min

95 $^{\circ}$ C 10 sec

Stage 2：PCR反应

Repeat: 40 times

95 $^{\circ}$ C 5 sec

60 $^{\circ}$ C 20 sec

◆特别提示：

本产品利用Taq酶抗体使Taq酶具有热启动功能，与其他公司的化学修饰型Hot Start用Taq酶相比，不需要PCR反应前的95 $^{\circ}$ C，5~15分钟酶的活性化反应。如果高温处理时间过长，会使酶的活性下降，其PCR的扩增效率、定量准确度等都会受到影响。PCR反应前的反转录酶的热变性失活通常设定为95 $^{\circ}$ C，10 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。

实验条件的选择

如果按照推荐的两步法条件进行反应效果不佳时，请按照下面的方法进行引物和PCR反应条件的研讨。

实验条件选择时，请从扩增特异性与扩增效率两方面进行综合考虑。要求能同时满足这两个条件的反应体系，才可以在较大浓度范围内进行很好的定量。

扩增效率高的实验体系应具备以下条件：

- 扩增产物起峰更早（Ct值小）。
- PCR扩增效率高（接近理论值 100%）。

1. 预变性:

预变性条件通常设定为95°C, 10~30 sec, 使用此条件对于难变性的环状质粒DNA和基因组DNA模板基本上也能够很好的变性。如果针对难变性的模板, 可以延长至1~2分钟。但是时间过长对模板有损伤, 并且容易使Taq酶降低活性, 不推荐使用2分钟以上的变性条件。

2. 变性:

荧光定量PCR扩增的片段一般小于300 bp。为了提高灵敏度, 提高扩增效率, 应优选100 bp左右的基因片段作为扩增检测的位点。因此变性条件一般设为95°C, 3~5 sec。

3. 退火/延伸:

荧光定量PCR通常将退火和延伸合并为一步, 60°C, 30sec。如果反应性能较差时, 温度可以在56°C~64°C范围内调整, 并适当延长反应时间。

质量标准

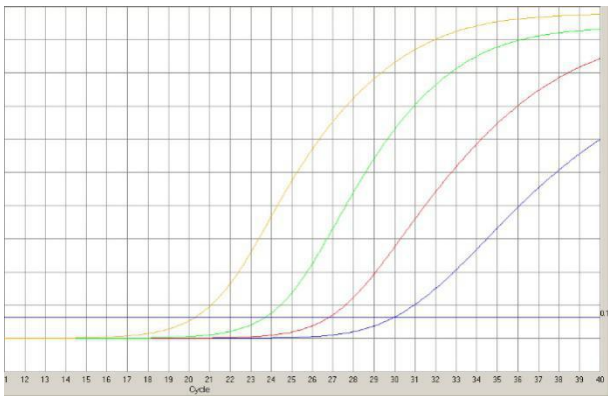
使用ABI Prism 7000 Sequence Detection System PCR扩增仪, 以HCV RNA进行Real Time One Step RT-PCR反应, 获得了良好的检测结果。

引物序列:

HCV-FP: 5'-CGAGTAGYGTGGGTTGC-3'

HCV-RP: 5'-GRTGCACGGTCTACGAGAC-3'

HCV-Probe: FAM-CCTTGTGGTACTGCCT-MGB



上图是分别从含 HCV 病毒 5 × 10⁵copies/ml、5 × 10⁴copies/ml、5 × 10³copies/ml、5 × 10²copies/ml 的血浆样本中提取的 10 μl RNA 用 2 × One Step Probe RT-PCR Mix 扩增的效果 (病毒 RNA 用 Simgen 病毒 RNA 纯化试剂盒提取)。

常见问题分析

1. 无 CT 值（信号）出现

- a. 模板量不足或模板严重降解。注意 RNA 模板极易降解，-20℃只能短期储存，长期贮藏应存放到-80℃。
- b. 模板中含有严重的抑制物。
- c. 未加入引物或探针。
- d. 未加入 RT-Taq 酶混合液。

2. 阴性对照也出现明显的扩增曲线

- a. 试剂或环境被扩增产物污染。注意不要打开 PCR 反应结束后的 PCR 管。
- b. 高浓度对照标准品（特别是质粒 DNA）具有与 PCR 扩增产物相同的污染能力，产生的气溶胶污染物同样不可忽略。
- c. 应选用带滤芯的吸头加模板，并注意不要混用 PCR I 区和 PCR II 区的移液器。
- d. 如确定试剂被扩增产物污染，应更换所有试剂，原有试剂全部予以丢弃。

3. 实验重复性不好

- a. 加样不准确。添加 ROX Reference Dye 可以修正加样导致的误差，如果仪器条件允许，应尽量添加 ROX Reference Dye 使用，不要省略。
- b. 仪器在样品上温度条件有差异，即温度均一性不好。尽量将 PCR 管放到中间，避免边缘效应。
- c. 模板浓度低。样品初始浓度越低，重复性越差，如果条件允许，尽量应减少模板的稀释倍数。

4. 扩增效率低

- a. 本产品若长期不用，请放置于-20℃贮存。
- b. 反应体系中有 PCR 反应抑制物。一般是加入模板时所引入，应先把模板适度稀释，再加入反应体系中，减少抑制物的影响。

5. 扩增曲线不正常

- a. 基线等设置不当。按仪器说明书重新操作。
- b. 模板量过多。当扩增曲线在 10 个循环内起峰时，应将模板稀释 100~1000 倍后使用。
- c. 在做 RNA 模板梯度时，PCR 结果无梯度相关性。可能是原始模板浓度过高，稀释浓度不够；或者原始模板浓度太低。
- d. 扩增曲线未呈现 S 性，呈直线型。可能是原始模板含较多的 PCR 抑制物，应减少模板用量，或稀释模板后再使用。