

THERMOcript One Step qRT-PCR Kit



北京艾德莱生物科技有限公司
Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

地址：北京市海淀区上地紫成创业园 C126--130

电话：010-82796972/82795296 (Fax)

网址：www.aidlab.cn 邮箱：info@aidlab.cn

使用说明书

包装量：

目录编号	包装单位
PC4201	50次
PC4202	100次

组成	PC4201	PC4202
2×qRT-PCR Mix(Contains Sybr Green I)	1.25ml	2x1.25ml
Enzyme Mix (Contains HotMaster DNA Polymerase and RNasin)	50 µl	100 µl
THERMOscript RTase	50 µl	100 µl
RNase free H ₂ O	1.5 ml	1.5 ml

产品组成、储存、浓度：

储存：-20℃ 保存，有效期 12 个月。

制品说明：本制品是采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂，用本制品进行 Real Time qRT-PCR 可在同一反应管内连续进行。反应过程中无需打开管盖添加试剂并可对扩增产物进行实时检测，避免了污染的同时提高了检测灵敏度和实验效率。非常适用于微量 RNA 尤其是微量 RNA 病毒的检测。本试剂盒包括最适合 Real Time PCR 的突变改造 M-MuLV H Minus 逆转录酶 (THERMOscript RTase)、热启动 HotMaster Taq DNA 聚合酶和 RNasin 抑制剂 mix、同时包含适用于逆转录和 PCR 扩增的优化独特反应体系。本酶 M-MuLV(RNase H⁻)的 RNase H 活性缺失，与 M-MuLV 相比，具有更强的延伸能力和稳定性。同时该酶多点突变提高了耐热性，可以在 50℃ 反转录，提高了复杂二级结构，GC 含量丰富模板反转录效率。而采用优质热启动酶 HotMaster Taq DNA Polymerase 可以最大限度的减少 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，对靶基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。

适用范围：适用于高拷贝、低拷贝基因检测；部分高 GC 含量或具有复杂二级结构的 RNA 模板。

注意事项：

- 当同时需要进行数次 Real Time One Step qRT-PCR 反应时，应先配制各种试剂的混合液 (Master Mix，其中包括 RNase-free ddH₂O、Buffer、各种酶等)，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。
- 使用 Enzyme Mix 和 TRUEscript RTase 时，分取之前要小心地瞬间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。
- 2×qRT-PCR Mix 内含 Sybr Green I，保存或配制 One Step qRT-PCR 反应液时应避免强光照射。
- 本制品不含 **Rox Reference Dye**，部分需要用 **Rox** 染料校准孔间差异的荧光定量 PCR 仪器可另外选购 **Rox Reference Dye (货号 PC38)**，说明书可以找我们索取或者登录 www.aidlab.cn 查看。
- 为保证反应成功建议使用高质量的 RNA 模板。
- 不同的片段，所需最佳 RNA 模板用量不同，过多的 RNA 会抑制反应，建议根据反应调整模板用量。
- 只能使用特异性引物，不能使用 Oligo(dT) 和 Random Primer 进行反应。

反应体系（以 20 μ l/50 μ l 举例）:

注意: 2 \times qRT-PCR Mix 使用前充分融解颠倒混匀（避免剧烈涡旋产生大量气泡）。短期频繁使用可放 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

根据下表冰上配制反应液:

Components	Volumn (25 μ l)	Volumn (50 μ l)	Final Concentration
2 \times qRT-PCR Mix	12.5 μ l	25 μ l	1 \times
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	1 μ l	0.2 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	1 μ l	0.2 μ M
Enzyme Mix	0.5 μ l	1 μ l	-
THERMOscript RTase	0.5 μ l	1 μ l	-
RNA template	X μ l	X μ l	1ng-1 μ g
RNase free H ₂ O to final volume	25 μ l	50 μ l	Not applicable

注意: 引物浓度请以终浓度 **0.2-0.6 μ M** 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。如果同进行多个反应，先按比例配成混合液，振荡混匀后，按每管 **50-X μ l** (X 为模板量)分装。

Real Time PCR 扩增:

1. 将配制好的反应体系混匀、离心后。
2. 将 PCR 仪器预热到 50 $^{\circ}$ C，将 PCR 管置于荧光定量 PCR 热循环仪中，按以下反应条件进行反应。

扩增程序:

	温度	时间	循环数
1	50 $^{\circ}$ C	20-30 分钟	1
2	94 $^{\circ}$ C	2-3 分钟	1
3	94 $^{\circ}$ C	20 秒	35-40
	55-60 $^{\circ}$ C	20 秒	
	72 $^{\circ}$ C	20 秒	
4	根据需要加入融链曲线分析		

注意: 如果所采用的荧光定量 PCR 仪器没有特殊的要求，建议采用上述图表显示的标准的三步法 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，例如采用两步法进行扩增可以减少非特异扩增，增强扩增的特异性。

3. 实验结果分析。反应结束后确认 One Step qRT-PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 RT-PCR 定量时制作标准曲线等。