



一步法 RT-qPCR Mix(探针法)

【产品名称】：一步法 RT-qPCR Mix(探针法)

【货号】： ZK00101

【包装规格】： 20T/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于各种动、植物、病毒RNA的荧光定量PCR检测，反转录PCR反应体系为50μl，用户在使用此试剂盒之前请详细阅读此说明书。

本试剂盒主要有两个部分组成：RT酶和2×反应缓冲液。RT酶由反转录酶和Taq DNA聚合酶组成的混合酶，既可cDNA合成又可PCR扩增。2×反应缓冲液对其主要成分Mg²⁺、dNTPs及稳定剂都已经优化，直接用于荧光定量PCR的检测，用户只需加入引物探针和一定的模板即可，适用各种荧光定量PCR仪如：lightcycler、ABI7500、icycler等。（本试剂盒不适合做sybr green染料法）

【主要组成成份】

组成	20T/盒	成分
2X反应buffer	600ul	50mMTris-HCl,10mMDTT
RT酶	70ul	反转录酶、Taq酶

【储存条件及有效期】

低温运输、保存于-20℃，有效期12个月。

【操作步骤】

- 取 10^3 - 10^6 拷贝的特异目的模板或 1pg-1μg 的总 RNA 或 1-10ng 纯化的 mRNA 于一支 0.2 或 0.5ml 离心管中，65-70℃保温 5-10 分钟，离心数秒，放置冰浴中。（此步骤是为了变性 RNA 建议保留）。
- 反应体系的配制：以下浓度仅供参考，以自己的实验条件为准。

组分	体积	终浓度
2×反应缓冲液	25μl	1×
下游引物*(25pmol/ul)	1.2ul	0.2-1μM
上游引物*(25pmol/ul)	1.2ul	0.2-1μM
荧光探针*(25pmol/ul)	0.5ul	0.05-0.4uM
RT 酶	3μl	
RNA 样品或对照**	Yμl	
DEPC-ddH ₂ O（加至终体积为 50μl）	Xμl	
终体积	50μl	



按照指定的体积将 DEPC-ddH₂O、2x 反应缓冲液、RT 酶、特异上下游引物探针加入到置于冰上的 0.2ml 薄壁反应管中，配制反应混合物，将反应管轻柔震荡 10 秒以使该混合物混匀。每次加样均应使用单独的加样器枪头，小心勿使样品之间相互污染。

* 计算引物为 50pmol 时所对应的质量（纳克）的通用公式为： $50\text{pmol}=16.3\text{ng}\times\text{bp}$ ；bp 为引物碱基数目。对于阳性对照反应，上、下游对照引物均使用 3.3 μl (50pmol)。

** 10^3 - 10^6 拷贝的特异目的模板或 1pg-1 μg 的总 RNA。使用 2 μl 带有载体的阳性对照 RNA (2.5 attomole 或 1×10^6 个拷贝)。

3. 如果热循环仪无热盖功能，则须加入1或2滴（20-40 μl ）无核酸酶的矿物油覆盖反应体系，以防止反应物浓缩和蒸发。以下程序仅供参考，以自己的实验程序为准：

1) ABI7500、7700、7300、icycler、Rotogene等荧光仪的程序设置

50 $^{\circ}\text{C}$ 反应10-30分钟，然后95 $^{\circ}\text{C}$ 保温1-5分钟，再按 95 $^{\circ}\text{C}$ 15秒 \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 30秒循环45次。

2) lightcycler荧光仪的程序设置

反应管置于LightCycler自动荧光PCR仪上，50 $^{\circ}\text{C}$ 反应10-20分钟，95 $^{\circ}\text{C}$ 2分钟，再按 95 $^{\circ}\text{C}$ 5秒 \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 20秒循环45次，每个循环的升降温速率为20 $^{\circ}\text{C}/\text{S}$ ，每个循环在60 $^{\circ}\text{C}$ 20秒处进行荧光检测设置。

试剂盒说明：

1. 储存：-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存，至少稳定12个月。
2. 用户所使用离心管、吸头均需经过DEPC处理并高压灭菌。
3. 总 RNA若有轻微降解，目的基因同样能扩增出来。
4. 如果不是用taqman探针，如beacon探针，可以使用三步法的扩增程序。
5. 第一步的反转录温度可以根据下游引物的退火温度在42度到50度之间调整。
6. 用户可以根据引物探针的T_m值，适当地调整退火温度
7. Only for Research!



上海闪晶生物科技有限公司

地址：上海市松江区新桥镇民强路 289 号 6 号门 2 楼

邮编：201612

联系：市场部

电话：021-54460832 800-988-1995

