

THERMOscript One Step qRT-PCR Kit

一步法荧光定量耐热反转录 PCR 试剂盒

目录号: PR109

包装量:

组成	PR109-01 (125次)	PR109-02 (250次)
2 XqRT-PCR Mix (Contains Sybr Green I)	1.25 ml	2x1.25 ml
THERMOscript OneStep Enzyme Mix	100 μ l	200 μ l
RNase free H ₂ O	1.5 ml	1.5 ml

产品组成、储存、浓度:

储存: -20°C 保存, 有效期 6 个月。

制品说明: 本试剂本制品是采用 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。非常适合于微量 RNA 尤其是微量 RNA 病毒的检测。本试剂盒包括最佳配比优化的 OneStep Enzyme Mix (包含突变改造 THERMOscript M-MuLV H Minus 耐热逆转录酶、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荧光 PCR 扩增的独特 2 XqRT-PCR Mix 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。同时该酶大大提高了耐热性, 可以在 50-55°C 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THERMOscript Enzyme Mix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 XqRT-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PR111-Rox Reference Dye。**
- 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。

建议反应体系（20 μl）:

注意: 2 XqRT-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°C冰箱。

根据下表冰上配制反应液:

Components	Volume	Final Concentration
2×qRT-PCR Mix	10 μl	1 X
Forward Primer (10μm)	0.4 μl	0.2 μM
Reverse Primer (10μm)	0.4 μl	0.2 μM
THERMOscript Enzyme Mix	0.8 μl	-
RNA template	X μl	1 pg-1μg
RNase free H ₂ O to final volume	20 μl	Not applicable

注意: 引物浓度请以终浓度 0.2-0.6μM 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 20-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°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°C	20-30 分钟	1
2	94°C	2-3 分钟	1
3	94°C	20 秒	35-40
	55-60°C	20 秒	
	72°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 qRT-PCR 定量时制作标准曲线等。