

One Step RT-qPCR Probe Kit v2

REF: EG22109S

储运条件

-20°C保存；尽量避免反复冻融。

产品组成

组分	规格
RTQ Enzyme Mix	250 µl
2×RTQ Reaction Buffer	3×1 ml

注: 本产品不含校正 ROX 染料。如有需要, 推荐使用 ROX Reference Dye (REF: CP18103)。

产品简介

One Step RT-qPCR Probe Kit v2 是以 RNA 为模板进行多重逆转录 - 荧光定量 PCR 反应的试剂盒。在实验的过程中, 逆转录和定量 PCR 在同一反应管中进行, 简化了实验操作, 降低了污染的风险。

本试剂盒利用耐热 Reverse Transcriptase 高效合成第一链 cDNA, 并利用热启动 Ab-Taq DNA Polymerase 进行定量扩增, 适用于探针法 qPCR。本产品已包含除引物和样品 RNA 以外的所有逆转录 - 荧光定量 PCR 组分, 包括 RNase 抑制剂、RTase、Ab-Taq。可减少操作步骤, 缩短加样时间, 降低了污染几率。

适配机型

不需要 Rox 校正:

Bio-Rad 全系列、Roche 全系列、Eppendorf 全系列、Takara 全系列、Qiagen 全系列、宏石全系列、天隆全系列、博日全系列、雅瑞全系列等;

需添加 High Rox:

ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT Fast, StepOne™, StepOne Plus™ 等;

需添加 Low Rox:

ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio™ 3 and 5, Stratagene MX3000P™, MX3005P™, MX4000P™ 等。

使用方法

1. 使用注意

- ① 使用前应室温充分融化, 混匀并瞬时离心;
- ② 反应液应尽量避免产生气泡;
- ③ 待测 RNA 应尽可能新鲜, 提取过程中严防 RNase 污染。

2. 建议的反应体系

试剂	使用量	终浓度
RTQ Enzyme Mix	1 µl	/
2×RTQ Reaction Buffer	10 µl	/
正向引物 (10 µM) ^a	0.4 µl	0.2 µM
反向引物 (10 µM) ^a	0.4 µl	0.2 µM
TaqMan 探针 (5 µM) ^b	1 µl	0.25 µM
RNA 模板 ^c	1 µg~1 µg	/
Nuclease-Free Water	To 20 µl	

a. 引物推荐终浓度为 0.2 µM, 效果不佳时可以在 0.1~1 µM 进行调整; 引物长度请设定 18~25 bp, GC 含量为 40%~60%;

b. 探针终浓度推荐为 0.25 µM, 效果不佳时可以在 0.1~1 µM 进行调整;

c. 模板推荐加样量为 1~5 µl。qPCR 灵敏度极高, 建议将模板进行稀释使用, 控制 Ct 值在 20~35 之间;

d. 请于超净工作台内配制, 并使用无核酸酶残留的枪头、反应管; 推荐使用带滤芯的枪头。避免交叉污染和气溶胶污染。

3. 反应程序 (可根据机型适当调整)

步骤	温度	时间
逆转录	50°C	10 min
预变性	97°C	1 min
变性	97°C	5 sec
退火 & 延伸	58°C	30 sec

← 40~45 Cycles

注意事项

1. 实验过程中请使用 RNase free 耗材。
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

常见问题

问题描述	可能原因	解决办法
扩增曲线混乱或缺失	仪器设置不正确	根据仪器说明书调整设置
	引物或模板浓度不当	调整引物和模板浓度
	PCR 反应条件不当	降低退火温度、延长延伸时间等。对于 GC 含量高的目标片段，可适当延长变性时间
	引物或模板存在高级结构	重新设计引物
	样品纯度不好	进一步纯化样品
定量值 重复性差	仪器设置不正确	根据仪器说明书调整设置
	样品纯度不好	进一步纯化样品
	引物浓度不当	尝试适当提高引物浓度
	PCR 反应条件不当	尝试降低退火温度、延长延伸时间等
	引物设计不当	重新设计引物，减少目标片段的高级结构
	实验操作误差	严格按照操作规程，保证反应体系中各组分体积精确
空白对照 出现信号	出现污染	首先更换空白对照的水；如果还发生同样情况，继续更换引物、枪头、PCR 管或启用新的 Mix