

版本号: FP230821

Multiplex One Step RT-qPCR Kit (Probe)

多重反转录-荧光定量试剂盒 (探针法)

目录号: FP324

产品内容

产品组成	FP324-01 20 μ l \times 125 rxn	FP324-02 20 μ l \times 500 rxn
2 \times Multiplex One Step RT-qPCR Buffer	1.25 ml	1.25 ml \times 4
25 \times Multiplex Enzyme Mix	100 μ l	400 μ l
50 \times ROX Reference Dye	250 μ l	1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	1 ml \times 4

储存条件

收到本产品后, 请立即置于-30~-15 $^{\circ}$ C下保存。保质期12个月。

从-30~-15 $^{\circ}$ C取出使用时, 将冻存的2 \times Multiplex One Step RT-qPCR Buffer和50 \times ROX Reference Dye融解, 然后轻轻颠倒混匀, 待溶液完全均一后再行使用。如需一段时间内经常取用, 可在2-8 $^{\circ}$ C下保存, 保质期3个月。避免反复多次冻融。

产品简介

本产品是采用探针法 (TaqMan[®], Molecular Beacon等) 进行Real Time One Step RT-qPCR的专用试剂。使用本产品进行RNA样品检测时, RNA的逆转录和PCR是在同一反应管内连续进行的, 操作简单, 避免了样品间交叉污染的同时也提高了检测的灵敏度, 特别适合低浓度RNA样品的快速、特异性检测。

试剂盒中的25×Multiplex Enzyme Mix是逆转录酶、抗体修饰热启动Taq DNA聚合酶和RNase Inhibitor的预混Mix形式, 其中的逆转录酶是分子改造后的新型逆转录酶, 具有热稳定性高, 灵敏度好, 酶活性稳定等优点, 使得不同类型的RNA样品均能快速, 稳定, 高效的进行逆转录反应; Taq DNA聚合酶经过热启动修饰, 保证逆转录后的PCR反应具备更高的扩增效率和特异性; RNase Inhibitor对逆转录过程中的RNA具有保护作用, 使得反应稳定持续进行。

另外, 本产品中的2×Multiplex One Step RT-qPCR Buffer是专门为上述Enzyme Mix而优化的新型反应体系, 其中包含反应所需的必要离子组分、dNTPs以及One Step 稳定剂和增强剂, 进一步保证RNA检测反应的快速, 高效, 稳定进行。

本产品反应快速, 灵敏度高, 特异性好, 适合同时对多个高低丰度的RNA靶标进行多重定量检测, 重复性好, 可信度高。

产品特点

- **提高反应效率:** 性能优良的逆转录酶和Taq DNA聚合酶保证了高效的反应效率;
- **操作简单快速:** 双组分产品组成, 方便操作; 酶活强劲, 反应快速;
- **模板普适性高:** 适用GC含量高、二级结构复杂、抑制物残留高等多类型RNA模板;
- **多重扩增检测:** 性能优异的酶蛋白搭配专有Buffer, 保证了RNA样品的多重检测。

用户自己需要准备的

1. 引物及探针;
2. 模板;
3. 一次性手套及其它耗材;

适用范围

RT-qPCR技术可用于检测细胞和组织中的基因表达水平及检测RNA病毒含量。

操作步骤

1. 完全融化模板RNA，特异性引物，2×Multiplex One Step RT-qPCR Buffer、50×ROX Reference Dye和RNase-Free ddH₂O，短暂离心后置于冰浴上。
2. 按下表在冰浴条件下配制反应液：

组成成分	体积/反应	反应浓度
2×Multiplex One Step RT-qPCR Buffer	10 μl	1×
25×Multiplex Enzyme Mix	0.8 μl	1×
上游特异性引物 (10 μM)	0.5 μl ^{*1}	250 nM
下游特异性引物 (10 μM)	0.5 μl ^{*1}	250 nM
探针 (10 μM)	0.4 μl ^{*2}	200 nM
RNA模板	10 pg-1 μg total RNA	
50×ROX Reference Dye ^{*3}	跟据不同仪器添加	1×或者5×
RNase-Free ddH ₂ O	补水至20 μl	
总体系	20 μl	

^{*1} 引物终浓度为250 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时，可增加PCR反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少PCR反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的，可以在50-900 nM范围内调整。

^{*2} 探针的浓度与使用的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说明进行。通常探针终浓度为200 nM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。需要进一步优化探针浓度的，可以在100-500 nM范围内调整。

^{*3} 几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表：

仪器	终浓度
ABI 5700/7000/7300/7700/7900HT/ StepOne™/ StepOne Plus™	5× (例如：2 μl ROX/20 μl体系)
ABI 7500、7500 Fast、ViiA 7、QuantStudio™、 12K Flex；Agilent Mx3000P、Mx3005P和Mx4000	1× (例如：0.4 μl ROX/20 μl体系)
Roche仪器，Bio-Rad仪器，Eppendorf仪器等	无需添加



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

3. 进行Real Time One Step RT-qPCR反应

PCR反应管用离心机瞬时离心后放入荧光定量PCR仪中进行Real Time PCR反应。建议采用下列图表显示的标准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。

反应步骤（建议）

反应温度	反应时间	反应循环数	说明
55°C	15 min	1	逆转录
95°C	2 min	1	预变性
95°C	15 sec	40	PCR循环步骤，请在该步骤收集荧光
60°C	30 sec		

4. 实验结果分析

反应结束后确认Real Time One Step RT-qPCR的扩增曲线、CT值、标准曲线等，并进行RT-qPCR定量结果分析。

注意事项

1. RNA 模板可以采用总RNA 或mRNA，建议使用TIANGEN公司生产的TRNzol或RNAprep Pure系列制备高质量的总RNA。
2. 一步法RT-qPCR 实验应避免RNase污染，可采用以下措施：
 - 1) 因人的皮肤表面和唾液都有RNase，因此实验中应戴一次性手套和口罩；
 - 2) 一步法RT-qPCR实验应使用专门的仪器和耗材，建议在专门区域操作RNA；
 - 3) 一步法RT-qPCR实验相关耗材应用0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在37°C处理12 h，并高压灭菌30 min后使用。
3. 25×Multiplex Enzyme Mix在取用之前应短暂离心收集溶液后再吸取，吸取时动作要慢，使用后应尽快放回-20°C。
4. 2×Multiplex One Step RT-qPCR Buffer在取用前应充分混匀并离心后使用。
5. 本试剂盒必须使用特异性引物，引物的选择可根据具体实验来选择。