

TRUEscript One Step qRT-PCR Probe 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
PC8501	125次×20μl
PC8502	250次×20μl

组成	PC8501	PC8502
2×qRT-PCR Probe Mix	1.25 ml	2×1.25 ml
TRUEscript OneStep Enzyme Mix	100 μl	200 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：本制品是采用探针法进行一步法反转录实时荧光定量检测的专用试剂盒。以提取的 RNA 为模板，在同一反应管内连续进行反转录和荧光定量检测，操作简单，并能有效防止污染、降低加样误差。基于高效反转录酶、热启动聚合酶、配合优化的 Buffer 体系，对于二级结构复杂和 GC 含量高的 RNA 模板扩增效果好，非常适合于 RNA 病毒等微量目标基因的检测。本产品使用时只需加入模板、引物、探针、ROX Reference Dye（用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，根据不同荧光定量 PCR 仪选择使用）和水，使其工作浓度为 1×，即可进行反应。具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点，可最大限度地减少人为误差、节约 PCR 实验操作时间、降低污染几率。

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。
- TRUEscript Enzyme Mix含甘油很粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头插入液面太深，导致吸头外壁沾附损失。
- 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领先的艾德莱RNA提取试剂盒得到高质量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 × qRT-PCR Probe Mix 使用前充分融解颠倒混匀（避免剧烈涡旋震荡产生过多气泡）。短期频繁使用可放 4℃ 冰箱。

根据下表冰上配制反应液：

	Volume	Final Concentration
2×qRT-PCR Probe Mix	10 µl	1 ×
Forward Primer (10 µm)	0.5 µl	0.25 µM
Reverse Primer (10 µm)	0.5 µl	0.25 µM
Probe (10 µm)	0.5 µl	0.25 µM
TRUEscript Enzyme Mix	0.8 µl	-
RNA template	X µl	≤1µg
RNase free H ₂ O to final volume	20 µl	Not applicable

注意：引物浓度请以终浓度 0.2-0.6 µM 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。探针浓度可根据具体情况在 50-300 nM 间调整。

Real Time PCR 扩增：

1. 将配制好的反应体系混匀，置于荧光定量 PCR 仪中，按以下反应条件进行反应。

扩增程序：

二步法流程	温度	时间	循环数
1	50°C	15 - 30 min	1
2	94°C	2 - 3 min	1
3	94°C	15 sec	35-45
	60°C	30-60 sec	
4	根据需要加入融链曲线分析		

三步法流程	温度	时间	循环数
1	50°C	15 - 30 min	1
2	94°C	2 - 3 min	1
3	94°C	15 sec	35-45
	55-60°C	15 sec	
	72°C	30 sec	
4	根据需要加入融链曲线分析		

注意：两步法特异性好，三步法扩增效率高。当两步法扩增效率不好的时候建议选择三步法进行 qPCR 反应。

2. 实验完成后进行结果分析。