

# TRUEscript One Step RT-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](http://www.aidlab.cn)

## 包装量：

目录编号	包装单位
PC8501	100次×20 µl
PC8502	200次×20 µl

组成	PC8501	PC8502
2×qRT-PCR Probe Mix	1 ml	2×1 ml
TRUEscript OneStep Enzyme Mix	100 µl	2×100 µl
ROX Reference Dye	25 µl	2×25 µl
RNase free H <sub>2</sub> O	1ml	2×1 ml

## 产品组成、储存、浓度：

储存：-20°C 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 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 ddH<sub>2</sub>O、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 TRUEscript 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。
- 配制反应体系的时候用到荧光探针，保存或配制 One Step qRT-PCR 反应液时应避免强光照射。
- 本制品包含 Rox Reference Dye，部分需要用 Rox 染料校准孔间差异的荧光定量 PCR 仪器可使用 Rox Reference Dye（货号 PC38），说明书可以找我们索取或者登录 [www.aidlab.cn](http://www.aidlab.cn) 查看。
- 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，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 进行一步法反转录反应。

### 建议反应体系 (20 $\mu$ l):

**注意:** 2 $\times$ qRT-PCR Probe 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 $^{\circ}$ C 冰箱。

#### 根据下表冰上配制反应液:

Components	Volume	Final Concentration
2 $\times$ qRT-PCR Probe Mix	10 $\mu$ l	1 $\times$
Forward Primer (10 $\mu$ m)	0.5 $\mu$ l	0.25 $\mu$ M
Reverse Primer (10 $\mu$ m)	0.5 $\mu$ l	0.25 $\mu$ M
Probe (10 $\mu$ m)	0.5 $\mu$ l	0.25 $\mu$ M
TRUEScript Enzyme Mix	1 $\mu$ l	-
RNA template	X $\mu$ l	1 ng-0.1 $\mu$ g
RNase free H <sub>2</sub> O to final volume	20 $\mu$ l	Not applicable

**注意:** 引物浓度请以终浓度 0.2-0.6  $\mu$ M 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、离心后。
2. 将 PCR 仪器预热到 50 $^{\circ}$ C, 将 PCR 管置于荧光定量 PCR 热循环仪中, 按以下程序进行反应。

#### 二步法扩增程序:

	温度	时间	循环数
1	50 $^{\circ}$ C	15-30 min	1
2	94 $^{\circ}$ C	2 min	1
3	94 $^{\circ}$ C	15 sec	35-45
	60 $^{\circ}$ C	30 sec	

#### 三步法扩增程序:

	温度	时间	循环数
1	50 $^{\circ}$ C	15-30 min	1
2	94 $^{\circ}$ C	2 min	1
3	94 $^{\circ}$ C	15 sec	35-45
	60 $^{\circ}$ C	15 sec	
	72 $^{\circ}$ C	30 sec	

**注意:** 首选采用标准的二步法 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, 例如尝试采用三步法进行扩增可以增强扩增效率。

3. 实验结果分析, 包括根据需要扩增曲线和融链曲线分析。