

产品简介

本制品是采用探针法(TaqMan[®], Molecular Beacon等)进行一步法RT-qPCR的专用试剂。使用本制品进行Real Time One Step RT-qPCR反应可在同一反应管内连续进行,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。

本试剂盒中的25×FastKing Enzyme Mix为TIANGEN新型逆转录酶(King RTase)、新型抗体修饰的热启动Taq DNA聚合酶及RNase Inhibitor的预混Mix形式,其中的King RTase是分子改造后的新型逆转录酶,特别增加了疏水motif,具有更强的RNA亲和性和热稳定性,提高了该酶的逆转录效率和对具有复杂二级结构RNA模板的延伸能力;PCR过程中采用了性能优良的新型热启动Taq DNA聚合酶,使得逆转录后的PCR反应具更高的扩增效率和特异性。另外,本产品中的2×FastKing One Step Probe RT-qPCR Master Mix是专门为上述两种关键酶而优化的新型反应体系,其中包含必要离子组分、dNTPs以及PCR稳定剂和增强剂,可保证King RTase和新型热启动Taq DNA聚合酶在整个一步法反应过程中发挥最大功效。

本制品可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线,对多种高低丰度的靶基因进行准确定量检测,重复性好,可信度高。

产品特点

反应灵敏高效:性能优良的逆转录酶和Taq酶保证了极高的反应效率;

操作简单快速:双组分的产品形式使得操作过程变得简单快速;

解决复杂模板:通读GC含量高,二级结构复杂的RNA模板;

样品普适性好:对不同物种来源及杂质较多的RNA模板的适用性高。

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技术可用于检测样本中目的基因表达水平及RNA病毒的含量。

操作步骤

1. 完全融化模板RNA,特异性引物,2×FastKing One Step Probe RT-qPCR MasterMix、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
2×FastKing One Step Probe RT-qPCR MasterMix	25 μl
25×FastKing Enzyme Mix	2 μl
上游特异性引物(10 μM)	1.25 μl ¹
下游特异性引物(10 μM)	1.25 μl ¹
探针(10 μM)	1.0 μl ²
RNA模板	10 pg-1 μg total RNA
50×ROX Reference Dye ³	根据不同仪器添加
RNase-Free ddH ₂ O	补水至50 μl
总体系	50 μl

^{*1}引物终浓度为0.25 μM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0.05-0.90 μM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0.20 μM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0.10-0.50 μM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 PRISM 7000/7300/7700/7900HT/Step One等	5×(例如:5 μl ROX/50 μl体系)
ABI 7500、7500 Fast、Viia 7; Stratagene Mx3000P、Mx3005P和Mx4000等	1×(例如:1 μl ROX/50 μl体系)
Roche仪器, Bio-Rad仪器, Eppendorf仪器等	不用添加

3. 进行Real Time One Step RT-qPCR反应

PCR反应管请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
50°C	30 min	1	逆转录
95°C	3 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

- 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。
- 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，因此实验中应佩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。
- 25×FastKing 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。
- 2×FastKing One Step Probe RT-qPCR Master Mix在取用前应充分混匀并离心后使用。
- 本试剂盒必须使用特异性引物，引物可根据具体实验来选择。

FastKing One Step RT-qPCR Kit(Probe) FastKing一步法反转录-荧光定量试剂盒 (探针法)

目录号: FP314

产品内容

产品组成	FP314-01 50 µl×50 rxn	FP314-02 50 µl×200 rxn
2×FastKing One Step Probe RT-qPCR MasterMix	1.25 ml	4×1.25 ml
25×FastKing Enzyme Mix	100 µl	400 µl
50×ROX Reference Dye	250 µl	1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2×1 ml	5×1 ml

储存条件

请将该试剂盒置于-20°C保存，保质期1年。

适用的Real Time PCR扩增仪

PRISM 7000/7700/7900HT, 7300/7500 Real-Time PCR System, 7500 Fast Real-Time PCR System, ViiA 7 (Applied Biosystems)

OPTICON™ / CFX96 (BIORAD)

Light Cycler 480 (Roche)

Smart Cycler® System (Cepheid)

Mx3000P/Mx3005P (Stratagene)

其他各种Real Time PCR扩增仪