



FastKing一步法反转录-荧光定 量试剂盒(Probe) (FP314) 操作指南

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170424

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. RNA样本
2. 移液器及配套枪头 (RNase-free)
3. 1.5 ml 离心管 (RNase-free) , 200 μ l PCR管 (RNase-free)
4. 涡旋振荡器, 台式离心机, 金属浴/ PCR仪



Step 1



融解 $2 \times$ FastKing One Step Probe RT-qPCR MasterMix, $50 \times$ ROX Reference Dye, RNA模板, 引物, 探针和RNase-Free ddH₂O, 并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀, 之后置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀, 简短离心以收集残留在管壁的液体。

Step 2

建议在冰上按下表进行Real Time PCR反应液的配制

组成成分	50 μ l 体系
2 \times FastKing One Step Probe RT-qPCR MasterMix	25 μ l
25 \times FastKing Enzyme Mix	2 μ l
上游特异性引物(10 μ M)	1.25 μ l
下游特异性引物(10 μ M)	1.25 μ l
探针(10 μ M)	1.0 μ l
RNA模板	10 pg-1 μ g total RNA
50 \times ROX Reference Dye	跟据不同仪器添加
RNase-Free ddH ₂ O	补水至50 μ l



Tips

1. 配制体系时，应首先确定所需的反应数量，然后在反应数量的基础上增加10%-20%，计算体系配制数量。例如，一共需要做5个定量反应时，则体系配制数量至少为6；一共需要做10个定量反应时，则体系配制数量至少为11；一共需要做20个定量反应时，体系配制数量至少为22。以此类推。
2. 按配制数量，先计算除RNA模板和水之外的组分所需的用量，在冰上将所有组分共同配制到同一管中制成混合物，彻底混匀，短暂离心。
3. 计算每个样本所需加入的RNA模板的体积和所需补充的ddH₂O的体积。如果每个样本所需的ddH₂O体积都相同，可计算总体所需的ddH₂O体积并加入到混合物中，彻底混匀。

试剂	1个50 μl体系 使用量	6个50 μl体系 使用量	11个50 μl体系 使用量	22个50 μl体系 使用量
2×FastKing One Step Probe RT-qPCR MasterMix	25 μl	150 μl	275 μl	550 μl
25×FastKing Enzyme Mix	2 μl	12 μl	22 μl	44 μl
上游特异性引物(10 μM)	1.25 μl	7.5 μl	13.75 μl	27.5 μl
下游特异性引物(10 μM)	1.25 μl	7.5 μl	13.75 μl	27.5 μl
探针(10 μM)	1.0 μl	6.0 μl	11.0 μl	22.0 μl
50×ROX Reference Dye	根据实际情况计算加入			
RNase-free ddH ₂ O	根据实际情况计算加入			

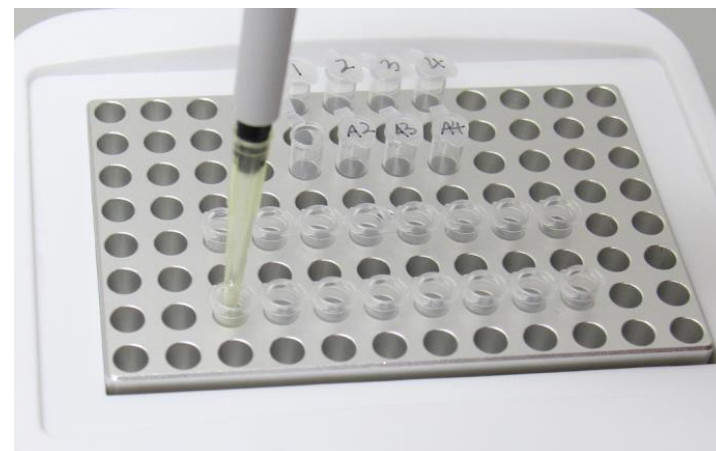
4. 将混合物分装至每个检测管/孔中，按混合物—RNA模板—ddH₂O（如果需要）的顺序加样，配制体系，彻底混匀。

Tips

使用预混Mix再分装的方法可以有效提高实验的重复性。配制和分装时请在冰上操作。

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0.05-0.9 μM 范围内调整。

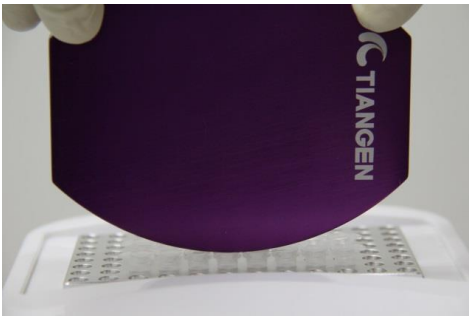
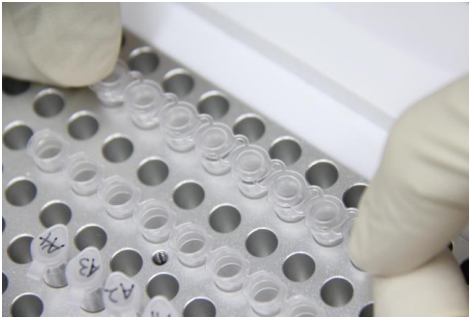
探针的浓度与使用的Real-Time PCR扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用说明进行。通常探针终浓度为0.2 μM 可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。需要进一步优化探针浓度的，可以在0.1-0.5 μM 范围内调整。



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/StepOne等	2.5 \times （例如：2.5 μl ROX/50 μl 体系）
ABI 7500、7500 Fast、ViiA 7； Stratagene Mx3000P、Mx3005P和Mx4000等	0.5 \times （例如：0.5 μl ROX/50 μl 体系）
Roche仪器，Bio-Rad仪器，Eppendorf仪器等	无需添加

Step 3



使用八连排管时，体系配制分装完毕后，改好管盖，用压盖器压实。在管盖两端做好标记，不要标记在检测孔正上方的管盖上，以免影响荧光读数。

使用96孔板时，体系配制分装完毕后，使用封口膜封板，压实，在孔板四周或未加样的检测孔出标记。

Step 4



使用微孔板离心机短暂离心96孔板或八连排管。注意管底朝向外侧，注意配平。
离心八连排管时，将八连排管置于管架上，用固定片固定后进行离心。

Step 5



阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
反转录	1×	50°C	30 min	反转录	否
预变性	1×	95°C	3 min	预变性	否
PCR 反应	40×	95°C	15 sec	变性	否
		60°C	30 sec	退火/延伸	是

将样本转移至荧光定量PCR仪，编好程序，开始qPCR反应。