

版本号: M16B01V1.0



ABScript II One Step

RT-qPCR Probe Kit

TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

目录: RK20407

规格: 20 RXN / 100 RXN (50 μ L/RXN)

产品组成:

2X One Step RT-qPCR Probe Buffer	RM21462
One Step Probe HS <i>Taq</i>	RM21463
ABScript II RT Enzyme Mix	RM21464
50X ROX Dye I	RM21465
50X ROX Dye II	RM21466
Nuclease-free H ₂ O	RM20214

产品说明

ABScript II One Step RT-qPCR Probe Kit 是采用探针法进行 RT-qPCR 反应的专用试剂盒。本试剂盒以 RNA 为模板, 使用基因特异性引物, 逆转录和 PCR 反应可在同一管内连续进行, 不用额外的开管、移液等操作, 大大提高了检测通量, 并能有效防止污染。本产品可以对扩增产物进行实时检测, 极大地提高了检测灵敏度, 并且省略了 PCR 反应后的电泳步骤, 非常适合于一些微量 RNA 的检测。本制品整合了 ABScript II Reverse Transcriptase 和 *Taq* DNA Polymerase 的优势, 配合优化的缓冲体系后, 扩增效率和特异性进一步加强, 能稳定高效的进行一步法 RT-qPCR 反应。

产品规格及组分

组分	20 RXN (50 μ L/RXN)	100 RXN (50 μ L/RXN)
2X One Step RT-qPCR Probe Buffer *	500 μ L	1.25 mL X 2
One Step Probe HS <i>Taq</i>	20 μ L	100 μ L
ABScript II RT Enzyme Mix**	20 μ L	100 μ L
50X ROX Dye I ***	20 μ L	100 μ L
50X ROX Dye II ***	20 μ L	100 μ L
Nuclease-free H ₂ O	500 μ L	1.25 mL X 2

*, 注: 含有 dNTPs, Mg²⁺ 等。

** , 注: 含有 ABScript II Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor。

***, 注: 用于校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

保存条件: -20°C

ROX Dye 适用机型

50X ROX Dye I

ABI 7300 Real-Time PCR System, ABI Step One, ABI Step One Plus 等。

50X ROX Dye II

ABI 7500 / 7500 Fast Real-Time PCR System, Stratagene Mx3000 / Mx3005P 等。

NO ROX Dye

Roche LightCycler480, Roche LightCycler96, Bio-Rad CFX96 等。

注意事项

- 2X One Step RT-qPCR Probe Buffer 在使用前请充分融解、混匀, 避免强光直射。若同时需要配制多个 One Step RT-qPCR 反应时, 应配制各种试剂的混合液, 然后再分装到每个反应管, 减少试剂损失。
- 试剂盒中的 ABScript II RT Enzyme Mix、One Step Probe HS *Taq* 含有高浓度甘油, 在使用前请轻轻混匀, 避免起泡; 分取之前应先混匀并离心, 使用后应立即放回 -20°C 冰箱保存。
- 反应液的配制和分装建议使用无污染的头、Microtube, 尽量避免污染。
- 为保证反应的成功, 建议使用高质量的 RNA 模板。
- 本试剂盒只能使用基因特异性引物, 不能使用随机引物或 Oligo dT 引物等进行反应。
- 设计一步法 RT-qPCR 实验的扩增引物时, 推荐扩增子在 70-200 bp, 效果最佳。

操作说明

实验准备

- 1.5 mL RNase-free EP 管、RNase-free PCR 管、移液器和枪头、冰盒或冰。
- PCR 探针、引物与模板。
- 荧光定量 PCR 专用管或平板。

实验方法

用户需自备的试剂：RNA 模板、引物、探针。请按照不同品牌荧光定量 PCR 仪的使用说明书进行实验操作。

1. One Step RT-qPCR 反应

推荐冰上配制反应体系。

推荐的反应体系

组分	加入量 (20 μ L 体系)	加入量 (50 μ L 体系)
2X One Step RT-qPCR Probe Buffer	10 μ L	25 μ L
One Step Probe HS <i>Taq</i>	0.4 μ L	1 μ L
ABScript II RT Enzyme Mix	0.4 μ L	1 μ L
正向引物(10 μ M) *	0.4 μ L	1 μ L
反向引物(10 μ M) *	0.4 μ L	1 μ L
TaqMan Probe (10 μ M) **	0.4 μ L	1 μ L
50X ROX Dye I	0.4 μ L	1 μ L
Total RNA ***	2 μ L	5 μ L
Nuclease-free H ₂ O	to 20 μ L	to 50 μ L

*, 注：通常引物终浓度为 0.2 μ M 时可以得到较好的结果，反应性能较差时，可以在 0.1-1.0 μ M 范围内调整引物浓度。扩增产物的长度建议在 70-200 bp 范围内。

**, 注：探针浓度可在 50-250 nM 内进行调整。

***, 注：建议 20 μ L 体系中加入 15 pg-150 ng 的 Total RNA 为模板。

推荐的反应程序

步骤	温度	时间	循环数 (Cycles)
逆转录	42°C	5 min	1
预变性	95°C	3 min	1
循环反应	95°C	5-15 s	40
	60°C	30-34 s *	

*, 注：延伸时间根据 qPCR 仪所需数据采集时间自行调整：如使用 StepOnePlus 时设定为 30 s；使用 7300 时设定为 31 s；使用 7500 时设定为 34 s。

反应结束后确认扩增曲线，进行标准曲线制作等。

2. 试验示例

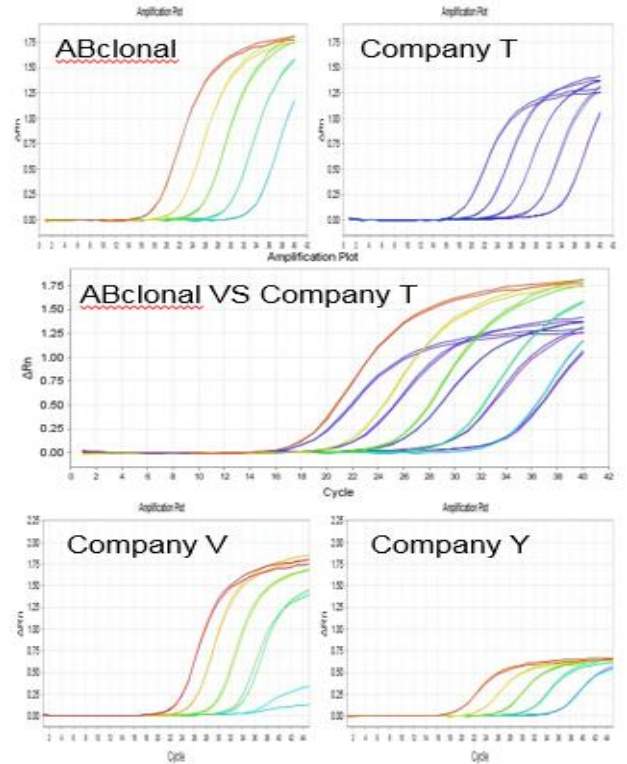


图 1：以大鼠 RNA 为模板(150 ng 为起始量)，5'端 VIC 荧光标记探针，10 倍梯度稀释，能很好的检测出目的基因，同其他厂家产品相比具有较高的检测灵敏性。

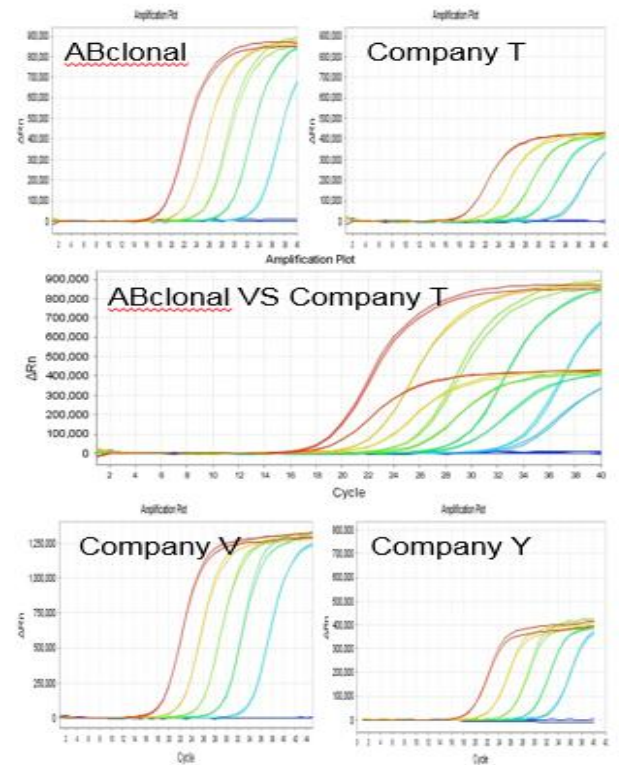


图 2：以大鼠 RNA 为模板(150 ng 为起始量)，5'端 FAM 荧光标记探针，10 倍梯度稀释，能很好的检测出目的基因，同其他厂家产品相比具有较高的检测灵敏性。