使用前请仔细阅读说明书　　版本号：202106

One Step RT-qPCR Kit (Probe)

货号：ER101　　规格：50T/100T　　保存：-20℃

产品说明：

本品是采用探针法进行一步法反转录-实时荧光定量的专用试剂，使用本品进行 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。本试剂盒采用新型逆转录酶（HI-MMLV Reverse Transcriptase）、新型抗体修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶及 RNase Inhibitor 的 One Step RT-qPCR Enzyme Mix 形式，具有更强的 RNA 亲和性和热稳定性，以及更高的扩增效率和特异性，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。

产品内容：

试剂组成	ER101-01（50T）	ER101-02（100T）
One Step RT-qPCR Enzyme Mix	50μl	100μl
5x One Step RT-qPCR Master Mix	250μl	500μl
RNase-Free ddH_2O	1ml	1ml*2

产品应用：

本试剂盒适用于探针一步法反转录-实时荧光定量 PCR，可以准确、简单的进行 RNA 的表达分析，尤其适合微量 RNA 的检测，适用于各类荧光定量 PCR 仪。

操作步骤：

1、在 RNase-Free 离心管中配制以下反应液：

试剂名称	使用量
One Step RT-qPCR Enzyme Mix	1μl
5x One Step RT-qPCR Master Mix	4μl
Forward Primer (10μM)	0.4μl
Reverse Primer (10μM)	0.4μl
Probe (10μM)	0.2μl
Total RNA	1pg-1μg
RNase-Free ddH_2O	Up to 20μl

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

1）一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2μM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在 0.1-1.0μM 范围内调整引物浓度。

2）探针浓度可以在 50nM-250nM 之间调整。

3）qPCR 灵度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果有很大的影响，推建将模板稀释后（如稀释 2-5μl 样本）加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。

4）扩增产物长度请选择在 80bp-200bp 范内。

5）如果使用 ABI 系列 Real Time PCR 仪时，在溶液配置时加入 50x ROX Reference dye。

2、按下列条件进行 One Step RT-qPCR 反应：

方法/步骤	标准程序	快速程序	循环数
50℃	15min	10min	1
95℃	3min	1min	1
95℃	15s	5s	45Cycles
60℃	30s	20s	

a. 对于具有复杂的二级结构和高 GC 区域的模板，将逆转录温度 55℃，有助于提高扩增效率和灵敏度。

b. 延伸时间请根据使用的 Real Time PCR 仪所需要的数据采集最短时间限制进行调整，使用 ABI 7700 和 ABI 7900 时至少 30s，在使用 ABI 7000 和 ABI 7300 时至少 31s，在使用 ABI 7500 时至少 34s。

c. 实际使用的 Real Time PCR 仪是否支持快速扩增循环，初次尝试请进行预实验确认。

3、反应结束后确认 Real Time PCR 仪扩增曲线，对结果进行分析。

注意事项：

1. One Step RT-qPCR Enzyme Mix 含有高浓度的甘油，使用前请短暂离心，收集到反应管底部，并用移液枪轻轻吹吸，充分混匀后使用。

2. 反应液配制请使用 RNase-Free 枪头，EP 管等，尽量避免污染。