

## One Step RT- PCR PreMix (探针法)

## 使用说明书

## 【前言】

本产品提供了一个灵敏、高效、快速地扩增并检测病原 RNA 的完整系统。One Step RT- PCR preMix 包含所有 RT-PCR 所需的、并经优化的 Reaction Buffer、RT 酶混合物等，使用者只需加入适量的引物、探针和待检样品，即可进行 One Step RT- PCR 检测。

本产品使用高效率 M-MLV 反转录酶和化学修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶，为 RT-PCR 反应提供了更高的产量及灵敏度、特异性。

本产品适用于 lncRNA, miRNA, RNA病毒检测进行一步法 RT-qPCR 探针法实验。

## 【试剂盒组成】

A2010A004	100test	A2010A004-5	500test
Master Mix	750μl 1支	Master Mix	750μl 1x5支
Enzyme Mix	500μl 1支	Enzyme Mix	500μl 1x5支

## 【用户自备的试剂、器材】

## 1. 引物、探针

试验前应准备好用于检测目的基因的引物、探针。引物、探针应用 HPLC 或 PAGE 纯化。

## 2. 实验用水

使用 DEPC 处理的 PCR 用纯水。

## 3. 待检样品

总 RNA, mRNA

## 4. RNasefree &amp; DNasefree 的 tip 头, 离心管, 薄壁 PCR 管等

## 5. 各种规格的移液器

## 6. Realtime PCR 仪

本产品适用于下列 Realtime PCR 仪: ABI PRISM<sup>®</sup>7700、ABI PRISM<sup>®</sup>7500、ABI PRISM<sup>®</sup>7300、ABI PRISM<sup>®</sup>7000、MJ Opticon、BIORAD iCycler、Roch LightCycler<sup>™</sup> 等 Realtime PCR 仪上使用, 具体使用方法请参照相应仪器的说明书。

## 【反应液配制】

反应液组份	加量 (μl)	终浓度	备注
One Step RT - PCR Reaction Buffer	7.5	1X	
Enzyme Mix	5	1X	
上游引物 (25uM)	0.3	0.3uM	用户自备
下游引物 (25uM)	0.3	0.3uM	用户自备
探针 (25uM)	0.15	0.15uM	用户自备
待检样品	5-10	10pg~100ng	用户自备
DEPC H <sub>2</sub> O	补足		用户自备
总体积	25ul		

注: 1 通常初次使用本试剂时, 可用引物浓度 300nM, 探针浓度 150nM 进行实验, 根据实验结果具体情况, 在 200~1000nM 范围内调整引物浓度, 在 50~400nM 范围内调整探针浓度以达到最佳检测效果。

2 引物、探针、待检样品的具体加量用户可以根据实际情况调整，同时增减 DEPC 水用量，保证总反应体积不变即可。

### 【RT-PCR 扩增检测】

- 1 将反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。
- 2 循环参数设定（请参照各类仪器的操作说明进行设置）

步骤	温度 (°C)	时间	循环数 (次)
1 逆转录反应	50	10-20 分钟	1
2 反转录酶灭活及解链	95	5 分钟	1
3 变性	95	10 秒	40-45
4 退火、延伸及检测荧光	60	30秒	
步骤 4 中 60°C 时荧光检测，检测通道：FAM/HEX/VIC/ROX/CY5			

注：以上扩增条件为实例，用户应根据引物的  $T_m$  值及扩增片段的大小来确定适合的变性时间、退火温度，退火时间和循环次数，黑体字部分必须保留。

### 【保存条件】

本产品原则上在 -20°C 以下冷冻保存，避免反复冻融。如果在短期内需持续使用时，融解后可在 4°C 保存，最长可保存 1 周。

### 【注意事项】

1. 本产品为研究用试剂。请勿作为诊断、临床试剂用。
2. 为保证实验结果的准确性和可靠性，请特别注意以下事项：
  - 2.1 使用已校准的移液器，选用进口一次性使用的 PCR 反应管、离心管、tip 头等进行样本处理及配液等操作，所有用具应不含 DNA 酶和 RNA 酶。
  - 2.2 引物、探针设计过程中应尽可能避免发夹结构、二聚体等现象的发生，探针的位置尽可能靠近上游引物，PCR 目标片段最好小于 200bp，尽可能在 150bp 以内。
  - 2.3 实验样品尽可能新鲜，提取过程应严防 RNA 酶污染及操作不当导致的 RNA 降解。
  - 2.4 使用本产品时建议对 RT-PCR 扩增条件、引物浓度和样品用量进行调整，选择最适当的引物浓度、样品浓度和 PCR 扩增条件。
3. 本产品使用前应在室温充分融解，并用漩涡震荡器充分混匀。
4. 统一配液后分装以减少加样误差，每次实验应设置阴性对照。
5. 禁止标记 PCR 反应管，避免外源性荧光信号干扰。
6. PCR 反应管中不能有气泡，否则会产生非特异的荧光信号。若有气泡，可先用手指将气泡弹破，然后再低速离心消除。
7. 实时荧光 PCR 仪器连续进行实验时，最好间隔一小时以上再使用。
8. 实时荧光 PCR 仪需经常校正和清洁载样板孔。
9. 若使用 Roche LightCycler™ 荧光 PCR 仪，应将毛细管放在专门套管中，以便分装反应体系和加入待检样品。前述操作完毕应低速离心数秒再将毛细管垂直缓慢放入样品架，以免折断；若发生折断，应小心取出，用专用小毛刷擦拭干净后方可进行扩增。
10. 实验室应严格分区，避免 PCR 产物污染。

品质保证：

所有产品由 Biotnt 进行品质保证。

如果客户使用中有任何问题，都可以联系 Biotnt 公司。

电话：4008801880 或 0086 21 51692391 传真：0086 21 51692391

Email: biotnt@biotnt.com

主页：www.biotnt.com

