



ELK Biotechnology

For research use only.

One Step Probe RT-PCR Mix

一步法探针反转录PCR试剂盒

| 货号 | 规格 | 储藏/有效期 |
|----------|---------------------|----------|
| EQ015-01 | 20 μ l x 100rxn | -20C°/两年 |
| EQ015-02 | 20 μ l x 500rxn | -20C°/两年 |

产品介绍

本产品是采用probe法进行 Real Time One Step RT-PCR 的专用试剂。使用本产品进行 Real Time RT-PCR 反应可在同一反应管内连续进行反转录和 PCR 扩增，操作简单，并能有效防止污染。本反应体系由于可以对扩增产物进行实时监测，大大提高了检测灵敏度，并省略了 PCR 反应后的电泳步骤，非常适合于 RNA 病毒的检测。

本产品使用了高效反转录酶和高特异性的热启动 Taq DNA 聚合酶，能进行稳定高效的 Real Time One Step RT-PCR 反应。针对以 ROX 作为校正染料的荧光定量 PCR 仪，本产品配有单独的 ROX 染料，用以校正定量 PCR 仪孔与孔之间产生的荧光信号误差。

试剂组成

| 组分 | EQ015-1 | EQ015-2 |
|-------------------------------|-------------|-------------|
| 2xOne Step RT-PCR Mix (Probe) | 1ml | 1.25 ml×4 |
| RT-PCR Enzyme Mix | 150 μ l | 750 μ l |
| 50xROX Dye | 250 μ l | 1.25 ml |
| RNase-free ddH2O | 1 ml | 1.25 ml×4 |
| 说明书 | 1 copy | 1 copy |

用户需自备的试剂和物品

1. PCR 引物。
2. RNA 模板。
3. 适用于荧光定量 PCR 的单管、8 联排管、或 96 孔 PCR 管(板)。
4. 微量移液器和带滤芯的洁净吸头。
5. Real Time PCR 扩增仪。

注意事项

1. 使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
(1). 请勿涡旋振荡混匀。



ELK Biotechnology

For research use only.

- (2).由于酶保存液中含有50%的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。
- (3).沉淀会导致溶液成分不均匀，使用前务必充分混匀试剂。
2. 保存本产品或配制PCR反应液时应避免强光照射。
3. 尽量减少反复冻融产品的次数，反复冻融可能使产品性能下降。
4. 配制反应液时，请使用洁净的吸头（推荐使用带滤芯的吸头）和离心管，尽量防止污染。
5. 配制反应液时，试剂请于冰上放置。

使用方法(建议反应体系)

1. 按下列组分配制PCR反应液，置于冰上。
2. 将解冻后的各个组分上下翻转混合均匀，按下表依次加入各组分分配制成PCR反应体系：

| 组成成分 | 体积 (μL) | | 终浓度 |
|----------------------------|---------------------|-------|-------|
| 2×One Step RT-PCR Mix | 10 | 25 | 1 x |
| RT-PCR Enzyme Mix | 1.5 | 3.75 | |
| PCR Forward Primer (10 μM) | 0.4 | 1 | 0.2μM |
| PCR Reverse Primer (10 μM) | 0.4 | 1 | 0.2μM |
| PCR Probe Primer (10 μM) | 0.4 | 1 | 0.2μM |
| 模板RNA | Total RNA 1 pg-1 μg | | |
| *50 x ROX Dye (可选) | 0.4 | 1 | 1x |
| RNase-free ddH2O | to 20 | to 50 | --- |

注意:1) 扩增产物长度选择在80-250bp范围内。

2) 反应体系推荐使用20ul或50ul。

*ROX染料

可根据选择的仪器在反应体系中加入ROX染料，将反应体系中的荧光信号标准化。

下表所列为使用不同仪器操作时所需的ROX量（每50μL反应体系）：

| 仪器 | 每50μL体系反应所需的ROX量 |
|--|------------------|
| ABI7300、7900HT、StepOne 等 | 5μL |
| ABI7500、7500Fast、ViiA7、Stratagene Mx3000™、Mx3005P™ 以及 Mx4000™ 等 | 1μL |
| Roche仪器、Bio-Rad仪器、Eppendorf 仪器等 | 无需添加 |

注意:引物终浓度请以终浓度0.2 μM-0.6μM作为设定范围的参考。扩增效率不高时，可以在0.1~1.0 μM范围内调整引物浓度



ELK Biotechnology

For research use only.

扩增程序：

| 阶段 | 循环数 | 温度 | 时间 |
|-------|--------|----------|--------|
| 逆转录 | 1x | 50°C | 15 min |
| 预变性 | 1x | 95°C | 30 sec |
| 变性 | 35-40x | 95°C | 5 sec |
| 退火/延伸 | | 60-65°C* | 30 sec |

备注：退火/延伸温度可根据引物 T_m 值调整。

结果分析

定量实验至少需要三个生物学重复。反应结束后需要确认扩增曲线。

实验条件的选择

实验条件选择时，请从扩增特异性与扩增效率两方面进行综合考虑。要求能同时满足这两个条件的反应体系，才可以在较大浓度范围内进行很好的定量。

扩增效率高的实验体系应具备以下条件：

1. 扩增产物起峰更早（CT值小）。
2. PCR扩增效率高（接近理论值 100%）。

常见问题分析

1. 无 CT 值（信号）出现

a. 模板量不足或模板严重降解。注意 RNA 模板极易降解，-20°C 只能短期储存，长期贮藏应存放到-80°C。

b. 模板中含有严重的抑制物。

c. 未加入引物。

d. 未加入 RT-PCR Enzyme Mix。



ELK Biotechnology

For research use only.

2. 阴性对照也出现明显的扩增曲线

- a. 试剂或环境被扩增产物污染。注意不要打开 PCR 反应结束后的PCR 管。
- b. 高浓度对照标准品（特别是质粒 DNA）具有与 PCR 扩增产物相同的污染能力，产生的气溶胶污染物同样不可忽略。
- c. 应选用带滤芯的吸头加模板，并注意不要混用 PCR I 区和 PCR II 区的移液器。
- d. 如确定试剂被扩增产物污染，应更换所有试剂，原有试剂全部予以丢弃。

3. 实验重复性不好

- a. 加样不准确。添加 ROX Reference Dye 可以修正加样导致的误差，如果仪器条件允许，应尽量添加 ROX Reference Dye 使用，不要省略。
- b. 仪器在样品上温度条件有差异，即温度均一性不好。尽量将PCR 管放到中间，避免边缘效应。
- c. 模板浓度低。样品初始浓度越低，重复性越差，如果条件允许，尽量应减少模板的稀释倍数。

4. 扩增效率低

- a. 本产品若长期不用，请放置于-20℃贮存。
- b. 反应体系中有PCR 反应抑制物。一般是加入模板时所引入，应先把模板适度稀释，再加入反应体系中，减少抑制物的影响。

5. 扩增曲线不正常

- a. 基线等设置不当。按仪器说明书重新操作。
- b. 模板量过多。当扩增曲线在 10 个循环内起峰时，应将模板稀释 100~1000 倍后使用。
- c. 在做 RNA 模板梯度时，PCR 结果无梯度相关性。可能是原始模板浓度过高，稀释浓度不够；或者原始模板浓度太低。
- d. 扩增曲线未呈现 S 性，呈直线型。可能是原始模板含较多的 PCR 抑制物，应减少模板用量，或稀释模板后再使用。