

GoldStarProbeOneStepRT-qPCRKit

项目号: G665836

储存条件: -20℃。

产品内容:

Component	G665836 100rxns	G665836 100rxns	G665836 100rxns
2×GoldStarProbeOneStepBuffer	1.4ml	1.4ml	1.4ml
GoldStarProbeOneStepEnzymeMix	100 μl	100 μl	100 μl
50×LowROX	-	50 μl	-
50×HighROX	-	-	50 μl
RNase-FreeWater	1.5ml	1.5ml	1.5ml

产品简介:

本产品是采用探针法 (TaqMan, MolecularBeacon 等) 进行一步法 Real-TimeRT-qPCR 的专用试剂盒。使用本产品进行 RealTimeRT-qPCR 反应时, 逆转录和定量 PCR 在同一反应体系中进行, 反应过程中无需添加试剂, 无需打开管盖, 避免了污染的同时提高了实验效率。本产品的检测灵敏度高, 荧光信号强, 信噪比高, 非常适合于 RNA 病毒等微量 RNA 的检测。其所包含的特殊缓冲系统能使逆转录酶与 DNA 聚合酶同时发挥最大功效, 提高反应效率。使用本产品可以得到更宽广的线性范围, 对目的基因定量更准确, 重复性好, 可信度高。ROX 染料用于校正定量 PCR 仪孔与孔之间产生的荧光信号误差, 一般用于 ABI、Stratagene 等公司的 RealTimePCR 扩增仪。不同仪器的激发光学系统有所不同, 因此 ROX 染料的浓度必须与相应的荧光定量 PCR 仪相匹配。

注意事项:

1. 本试剂盒中试剂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。
2. 本产品以 RNA 为模板进行一步法 RT-PCR 实验, 在操作过程中应避免 RNase 污染, 建议在专门的区域进行 RNA 操作, 使用专门的仪器和耗材, 操作人员戴口罩和一次性手套并经常更换手套, 实验相关耗材应用 0.1%DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液在 37 °C 处理 12 小时, 并高压灭菌 30 分钟后使用。
3. 本试剂盒中的各试剂应尽量避免反复冻融, 反复冻融可能使产品性能下降。
4. 本试剂盒必须使用特异性引物, 引物的选择可根据具体实验来选择, 引物设计的好坏直接影响到 RT-qPCR 反应的结果, 设计引物时需考虑 GC 含量, 引物长度, 引物位置, PCR 产物的二级结构等因素, 建议采用专业的引物设计软件进行设计。
5. 本试剂盒推荐使用特异性探针, 建议采用专业的设计软件进行设计。

使用方法:

以下举例为常规的反应体系和反应条件, 实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小的不同进行相应的改进和优化。(反应液的配置请在冰上进行)

1. 将 RNA 模板、引物、2×GoldStar Probe One Step Buffer、GoldStar Probe OneStep EnzymeMix 和 RNase-Free Water 溶解并置于冰上备用。
2. PCR 反应体系:

试剂	25 μl 反应体系	终浓度
----	------------	-----

2×GoldStar Probe One Step Buffer	12.5 μl	1×
Forward Primer, 10 μM	0.5 μl	0.2 μM 1)
Reverse Primer, 10 μM	0.5 μl	0.2 μM 1)
Probe, 10 μM	0.5 μl	0.2 μM 2)
GoldStarProbeOne Step EnzymeMix	1.0 μl	/
RNATemplate	X μl	10 pg - 100 ng3)
50×Low ROXor High ROX (optional) 4)	0.5 μl	1×
RNase-Free Water	upto 25 μl	/

注意:

- 1) 通常引物浓度以 0.2 μM 可以得到较好结果, 可以在 0.1-1.0 μM 作为设定范围的参考。
- 2) 使用的探针浓度, 与使用的荧光定量 PCR 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要求进行浓度的调节。
- 3) 通常 RNA 模板的量以 10pg - 100ng 为参照, 因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同, 可对模板进行梯度稀释, 以确定最佳的模板使用量。
- 4) 不同仪器的激发光学系统有所不同, 根据使用荧光定量的仪器选择加入 50×LowROXor50× High ROX。

3. 混匀, 短暂离心, 将溶液收集到管底。

4. RT-PCR 反应条件:

步骤	温度	时间	/
逆转录	45°C	10min	/
PCR 预变性	95°C	10min	/
变性	95°C	15s	30-40 个循环
退火/延伸	60°C	45s	30-40 个循环

注意:

- 1) 本产品所采用的热启动酶须在预变性 95°C、5-10 min 条件下实现酶的活化。
- 2) 建议采用两步法 PCR 反应程序, 若因使用 T_m 值较低的引物等原因, 得不到良好的实验结果时, 可尝试进行三步法 PCR 扩增, 退火温度请以 56°C-64°C 的范围作为设定参考。

