



## PreScript One-Step RT-qPCR Probe Kit

货号：S034A/B

### ● 产品内容

组分	S034A	S034B
2× One-Step RT-PCR Buffer	1.25mL× 2	1.25mL× 4
C-SsoRobust Taq DNA Polymerase(5U/μL)	100μL	200μL
Prescript III RT Enzyme Mix	100μL	200μL
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	1.25mL× 2	1.25mL× 4
Rox Reference Dye II(50×)	100μL	200μL
Rox Reference Dye(50×)	100μL	200μL

### ● 储存条件

收到本产品后，请立即置于-20°C保存。

## ● 产品简介

本产品是采用探针法进行 One Step RT-qPCR 反应的专用试剂。使用本制品进行 RT-qPCR 反应可在同一反应管内连续进行，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检测，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 病毒等微量 RNA 的检测。

本制品中使用了适合于 RT-qPCR 的反转录酶 Prescript III RTase 和具有高扩增效率和高扩增特异性的 C-SsoRobust Taq DNA Polymerase，能进行稳定的 Real Time One Step RT-PCR 反应。

## ● 机型选择指南

ROX Reference Dye/Dye II 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差：

### ❖ 需要使用 ROX Reference Dye 校正的仪器

Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne™, StepOnePlus™；  
其他需要添加高浓度 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪。

### ❖ 需要使用 ROX Reference Dye II 校正的仪器

Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA™7；  
Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™；  
其他需要添加低浓度 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪。

### ❖ 不需要校正的仪器

Bio-Rad 品牌：Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5 等；  
Roche 品牌：LightCycler 480 System；  
Takara 品牌：Thermal Cycler Dice Real Time System 系列；  
Eppendorf 品牌：Mastercycler® ep realplex, realplex 2 s；  
其他不需要添加 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪。

## ● 使用注意事项

- ❖ 当同时需要进行数次 Real Time One Step RT-PCR 反应时，应先配制各种试剂的混合液，然后再分装到每个反应管中。这样，可使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失，避免重复分取同一试剂。同时也可减少实验操作或实验样品之间产生的误差。
- ❖ 使用 Prescript III RT Enzyme Mix 和 C-SsoRobust Taq DNA Polymerase 时，应轻轻混匀，避免起泡；分取之前要小心地离心收集到反应管底部；由于酶保存液中含有 50% 的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。
- ❖ 2× One-Step RT-PCR Buffer 融解后如有不溶物请充分混合。

## 操作方法

### 1. 反应体系准备

1) 建议在冰上进行 RT-qPCR 反应液的配制，反应体系如下所示。

Add RNase Free ddH <sub>2</sub> O	To 25 μL
2× One-Step RT-PCR Buffer	12.5 μL
C-SsoRobust Taq DNA Polymerase(5U/μL)	0.5 μL
Prescript III RT Enzyme Mix	0.5 μL
Forward Primer ( 10μM )★	0.5 μL
Reverse Primer ( 10μM )★	0.5 μL
Rox Reference Dye(50×)★★	0.4 μL
Rox Reference Dye II(50×)★★★	0.4 μL
Total RNA★★★	2 μL

★ 引物终浓度为 0.2 μM 可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时，可增加 PCR 反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少 PCR 反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的，可以在 0.1-1.0 μM 范围内调整。

★★ 请参照仪器型号进行选择使用

★★★ 建议在反应液中使用 10pg~100ng 的 Total RNA 模板

2) 盖上反应管，轻柔混匀。可短暂离心，确保所有组分均在管底。

2. 设置好反应程序后，将反应体系置于荧光定量 PCR 仪中，并立即运行反应程序。  
建议采用如下反应程序：

阶段	温度	时间	循环	荧光信号采集
反转录	50°C	5 min	1 ×	否
预变性	95°C	10 min	1 ×	否
PCR 反应	95°C	5 Sec	40×	否
	60°C <sup>△</sup>	30 Sec★★★		是
熔解曲线分析				

★★★ 部分 qPCR 仪器的退火及延伸时间必须设定在 30 Sec 以上时，请以最小值设定即可。

技术咨询：QQ/973107308

Tel/18927539098

Email/enzyvalley@163.com