

一步法RT-qPCR 2×SuperMix (Taqman) 目录号: AQ0402 使用前请仔细阅读说明书

Component	AQ0402A	AQ0402B	AQ0402C	AQ0402D
一步法RT-qPCR 2×SuperMix (Taqman)	1ml	1ml×5	5ml×4	5ml×10
Nuclease free Water	1ml	5ml	5ml×4	5ml×10

产品说明:

本产品一步法RT-qPCR 2×SuperMix(Taqman)用于RNA分子的定量分析, 由于采用Taqman探针进行定量, 消除了引物二聚体和非特异性扩增产物带来的假阳性误差。本产品包含MMLV RTase2.0、RNase Inhibitor、热启动型Taq DNA聚合酶、dNTPs和优化的反应缓冲液, 浓度为2×。RT-qPCR反应时, 只需加入RNA模板、引物和DEPC处理水, 使2×SuperMix溶液的浓度为1×即可进行反应。RNA样本类型包括总RNA、mRNA、核糖体RNA、tRNA等。核心组分之一MMLV RTase2.0经基因工程改造, 热稳定性显著提高, 可以耐受55-60度, 使得反转录反应可以在50-55度进行, 从而消除了RNA二级结构对反转录的抑制作用。Buffer专门针对RT-qPCR进行了优化, MMLV RTase和Taq DNA聚合酶在该Buffer中均有较高活性, 且Taqman探针释放信号高, 非常适合于Taqman探针型一步法RT-qPCR。

特点:

- 一步法减少RT-qPCR操作时间。
- 避免因多步操作带来的污染。
- RNA片段的定量 (≤3 kb)。
- 热启动Taq酶, 非特异性扩增导致的假阳性信号低, 扩增效率高、稳定性好。
- 采用Taqman探针进行定量, 消除了引物二聚体和非特异性扩增产物带来的假阳性。
- MMLV RTase2.0可以在50-55度反转录, 从而消除了RNA二级结构对反转录的抑制作用。

适用范围:

RNA样品 (mRNA、rRNA等) 的RT-qPCR定量, Taqman探针型定量。

保存:

4度保存1个月; -20℃保存1年。

注意事项:

- 本品在4度避光保存1个月内稳定, 尽量避免反复冻融, 以免造成酶活下降。如每次使用量较少, 推荐小份分装使用。
- 使用前请上下颠倒以混匀Master Mix, 短暂低速离心后即可使用。请勿vortex避免酶失活, 影响定量结果。
- 加样过程中轻柔吹打, 如果操作不慎导致SuperMix起泡, 需离心方可使用。
- 本品使用时额外加入的Taqman荧光探针需避光, 因此配制反应体系时应尽量避免强光照射。
- 为了防止环境DNA的污染, 反应体系配制时请于超净工作台内进行, 配制过程中请使用灭菌枪头、反应管。
- 由于本品检测灵敏度极高, 易被空气中气溶胶污染。因此如经常检测某些特定基因, 为了避免气溶胶污染, 建议使用本公司的UDG型Taqman探针型一步法RT-qPCR 2×SuperMix (AQ0412系列)

应用举例：一步法RT-qPCR (Taqman探针)

一步法 RT-PCR 将 RNA 反转录合成 cDNA、目标 cDNA 的 PCR 反应合二为一。以下反应举例为 50 μ l 标准一步法RT-PCR 体系，仅供参考。实际 RT-PCR 条件应根据模板、引物、目的片段大小加以优化，确定最佳反应条件。

1. 在无RNase A污染的PCR管中配制如下混合液

Component	Volume	Final Concentration
RT-qPCR 2 \times SuperMix (Taqman)	25 μ l	1 \times
Forward Primer (10 μ M)	1.5 μ l	0.3 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	1.5 μ l	0.3 μ M
Taqman探针 (10 μ M)	0.5-1.0 μ l	0.1-0.2 μ M
RNA Template*	Variable	as required
dd H ₂ O	Variable	-
Total volume	50 μ l	-

* Total RNA 的使用量一般为 10 ng~1 μ g；mRNA 的使用量一般为 1ng~1 μ g

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

- Taqman探针的浓度一般在0.05-0.2 μ M，可能需根据扩增基因和探针的不同而进行浓度优化。
- 一般来说反应体系中引物终浓度为0.2 μ M即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度0.1 - 1.0 μ M范围内调整引物浓度。

2. 按下列条件进行qPCR反应

(1) 常规扩增条件

50 $^{\circ}$ C	30min	反转录
95 $^{\circ}$ C	1 min	预变性
95 $^{\circ}$ C	5-10 sec	循环扩增 30-40 Cycles
50~60 $^{\circ}$ C	15 sec	
72 $^{\circ}$ C	15 sec	
72 $^{\circ}$ C	1 min	

(2) 退火延伸一步法扩增条件

50 $^{\circ}$ C	30min	反转录
95 $^{\circ}$ C	1 min	预变性
95 $^{\circ}$ C	5-10 sec	循环扩增
60-68 $^{\circ}$ C	30 sec	30-40 Cycles
72 $^{\circ}$ C	1min	

注意事项

- 本反转录反应条件适合绝大多数RNA，如RNA模板结构复杂，可将反转录温度提高到55度，以提高反转录效果。
- PCR阶段常规变性时间选择10 sec；快速变性时间最短可选5 sec。
- 常规扩增条件的退火温度可以根据引物的T_m值进行调整，当T_m较高时可以提高退火温度，增加扩增条带的特异性。
- (1) 常规扩增条件下，200-300 bp片段延伸时间72度15 sec，200 bp以内片段72度10 sec；(2) 退火延伸一步法扩增条件下，200-300 bp片段延伸时间60度30 sec；200 bp以内片段延伸时间60度20 sec。
- 退火延伸一步法扩增条件下的引物T_m值需要高于延伸温度3-5度。
- 仪器类型不同，融解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认融解曲线采集程序即可。