



GoldStar Probe One Step RT-qPCR Kit

目录号： CW2632S CW2633S（100 rxns）

保存条件： -20℃避光保存。

如需频繁使用，可存放于2-8℃，尽量避免反复冻融。

产品内容

Component	CW2632S	CW2633S
	100 rxns	100 rxns
2×GoldStar Probe One Step Buffer	1.4 ml	1.4 ml
GoldStar Probe One Step EnzymeMix	100 μl	100 μl
50×Low ROX	50 μl	-
50×High ROX	-	50 μl
RNase-Free Water	1.5 ml	1.5 ml

产品简介

本产品是采用探针法（TaqMan, Molecular Beacon等）进行一步法Real-Time RT-qPCR的专用试剂盒。使用本产品进行Real Time RT-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Real Time PCR 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。

需要Low ROX校正的仪器：（CW2632）

ABI Prism7500/7500 Fast, QuantStudio® 3 System, QuantStudio® 5 System, QuantStudio® 6 Flex System, QuantStudio® 7 Flex System, ViiA 7 system, Stratagene Mx3000/Mx3005P, Corbett Rotor Gene 3000等。

需要High ROX校正的仪器：（CW2633）

ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One/Step One Plus等。

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，操作人员带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℃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 One Step 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⁾
GoldStar Probe One Step EnzymeMix	1.0 µl	
RNA Template	X µl	10 pg – 100 ng ³⁾
50×Low ROX or High ROX （optional） ⁴⁾	0.5 µl	1×
RNase-Free Water	up to 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10 pg – 100 ng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×Low ROX or 50×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℃	10 min	
PCR预变性	95℃	10 min ¹⁾	
变性	95℃	15 s	} 30-40 个循环
退火/延伸 ²⁾	60℃	45 s	

注意：1) 本产品所采用的热启动酶须在预变性95℃、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Tm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℃-64℃的范围作为设定参考。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其他用途