

## TaqMan One Step RT-qPCR Kit (Probe qRT-PCR)

**货号:** T2210

**规格:** 50T/200T (25 $\mu$ l 体系为例)

**试剂组成:**

25 $\times$ One Step RT-qPCR RTase mix

5 $\times$ One Step RT-qPCR Buffer

10 $\times$ Enhancer

**保存:** -20 $^{\circ}$ C 保存长期保存, 使用前应混匀, 避免反复冻融。

**产品说明:**

TaqMan One Step RT-qPCR kit (qRT-PCR Probe) 是一步法 (One Step) RT-PCR 荧光定量探针法定性、定量反应的专用试剂, 反应过程在同一管内连续进行, 避免开管, 能有效防止污染。本品含有高温反转录酶 (RNase H-) 和新型热启动酶, 具有更高的反转录和 PCR 扩增效率, 适合于低浓度 RNA 模板的高灵敏度扩增。本试剂采用优化配方的专用 Buffer, 可以在较宽的定量区域内得到良好的标准曲线, 准确进行定量, 并与多数厂家的荧光定量 PCR 仪兼容, 如 Applied Biosystems、Eppendorf、Bio-Rad 和 Roche 等。

**试剂原理:**

TaqMan One Step RT-qPCR kit 首先利用反转录酶 RTase 将 RNA 反转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板通过热启动 DNA 扩增酶在单管闭管反应体系中连续进行 PCR 扩增反应, 利用荧光标记探针 (Probe) 水解发光, 并对发光信号进行检测。

**1. RT-PCR**

首先采用反转录酶以 RNA 为模板合成 cDNA, 然后再以合成的 cDNA 为模板, 经过 PCR 扩增反应的热变性、引物退火、链延伸三个步骤循环往复, 在短时间内扩增得到大量 DNA 片段。

**2. 荧光检出**

TaqMan 探针法是使用 5' 端带有荧光物质, 3' 端带有淬灭物质的 TaqMan 探针进行荧光检测的方法。在探针没有被 Taq 酶分解时, 5' 端的荧光物质受到 3' 端淬灭物质的制约, 不能发出荧光。而当 TaqMan 探针被分解后, 5' 端的荧光物质便会游离出来, 发出荧光。在 PCR 反应液中加入荧光探针后的退火过程中, 荧光探针便会和模板配对区域结合。在 PCR 反应的延伸过程中, Taq DNA 聚合酶的 5'  $\rightarrow$  3' 核酸外切酶活性可以分解和模板杂交的荧光探针, 游离出的荧光物质便会发出荧光。通过检测反应体系中的荧光强度, 可以达到检测 PCR 产物扩增量的目的。

**反应条件:**

(1) PCR 程序 (两步法)

反转录: 50 $^{\circ}$ C 20 分钟;

变性: 95 $^{\circ}$ C 3 分钟;

变性: 95 $^{\circ}$ C 10~20 秒;

退火/延伸: 60 $^{\circ}$ C 20~60 秒。 } 35~50 个循环

## 2、PCR 程序（三步法）

反转录：50℃ 20 分钟；

变 性：95℃ 3 分钟；

变 性：95℃ 10~20 秒；

退 火：56-64℃ 10~30 秒；

延 伸：72℃ 10~60 秒。

} 35~50 个循环

### RT-PCR 反应体系配制

试剂	25 $\mu$ l 体系	50 $\mu$ l 体系	终浓度
25 $\times$ One Step RT-qPCR RTase mix	1	2	1 $\times$
5 $\times$ One Step RT-qPCR Buffer	5	10	1 $\times$
Primer 1 (10 $\mu$ M)	0.5-2.5 $\mu$ l	1-5 $\mu$ l	0.2~0.4 $\mu$ M
Primer 2 (10 $\mu$ M)	0.5-2.5 $\mu$ l	1-5 $\mu$ l	0.2~0.4 $\mu$ M
TaqMan Probe	-	-	0.1~0.5 $\mu$ M
10 $\times$ Enhancer	2.5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	1 $\times$
RNA	1-2 $\mu$ l	2-4 $\mu$ l -	-
ddH <sub>2</sub> O	-	-	-
Total volume	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l	

1. 通常引物终浓度为 0.2 $\mu$ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0 $\mu$ M 范围内调整引物浓度；
2. 通常探针浓度可在 0.1~0.3 $\mu$ M 范围内优化。可进行浓度梯度的实验，寻找引物和探针的最佳组合。探针的使用与 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，请参照仪器说明书或各荧光探针的具体使用要求进行；
3. 不同种类的模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的模板添加量。

### 质量控制：

1. 功能检测：qPCR 的敏感性、特异性、可重复性；
2. 无外源核酸酶活性，无外源内切、外切核酸酶污染。

### 技术说明：

1. 该体系常用 50℃ 进行反转录反应，可以在 45℃~60℃ 范围内进行反转录温度优化；根据反应特征不同，可以在 5~30 分钟内对反转录时间进行优化；
2. 该体系所用的反转录酶是在 MMLV 基础上进行了基因改造，去除了 RNaseH 活性，使其具有更高的温度耐受性和反转录温度，对 RNA 复杂结构模板具有更高的反转录效率；
3. 该体系具有更好的体系稳定性和适用性，非常适合于病毒类、组织提取 RNA 复杂模板的检测；对极限浓度模板的扩增效果更加稳定。