

# M5 Super Taqman One-Step RT-qPCR Kit (Low Rox) 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Super Taqman One-Step RT-qPCR Kit	100T	MF827-01

## 【储存条件】

-20°C。如需频繁使用，可存放于 2-8°C，尽量避免反复冻融。

## 【产品组分】

2xSuper TaqMan OneStep Buffer	1.4 ml
Super OneStep Enzyme	100 $\mu$ l
RNase-Free Water	1 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。

## 【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 °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。

## 【操作步骤】

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× Super TaqMan OneStep Buffer、Super OneStep Enzyme 和 RNase-Free Water 溶解并置于冰上备用。

## 2. PCR 反应体系:

试剂	25 $\mu$ l 反应体系	终浓度
2 $\times$ Super TaqMan OneStep Buffer	12.5 $\mu$ l	1 $\times$
Forward Primer, 10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M <sup>1)</sup>
Reverse Primer, 10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M <sup>1)</sup>
Probe, 10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M <sup>2)</sup>
Super OneStep Enzyme	1.0 $\mu$ l	
RNA Template	X $\mu$ l	10 pg – 100 ng <sup>3)</sup>
RNase-Free Water	up to 25 $\mu$ l	

## 注意:

- 1) 通常引物浓度以 0.2  $\mu$ M 可以得到较好结果, 可以在 0.1-1.0  $\mu$ M 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。

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 $^{\circ}$ C	20 min	
PCR预变性	95 $^{\circ}$ C	2-5 min <sup>1)</sup>	} 30-40 个循环
变性	95 $^{\circ}$ C	15 s	
退火/延伸 <sup>2)</sup>	60 $^{\circ}$ C	30-45 s	

## 注意:

- 1) 本产品所采用的热启动酶须在预变性 95 $^{\circ}$ C、2-5 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 $^{\circ}$ C-64 $^{\circ}$ C 的范围作为设定参考。

## 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。