

# ABScript II One Step

## RT-qPCR Probe Kit

TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

目录: RK20407

规格: 20 RXN / 100 RXN (50  $\mu$ L/RXN)

产品组成:

2X One Step RT-qPCR Probe Buffer	RM21462
One Step Probe HS <i>Taq</i>	RM21463
ABScript II RT Enzyme Mix	RM21464
50X ROX Dye I	RM21465
50X ROX Dye II	RM21466
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	RM20214

### 产品说明

ABScript II One Step RT-qPCR Probe Kit 是采用探针法进行 RT-qPCR 反应的专用试剂盒。本试剂盒以 RNA 为模板, 使用基因特异性引物, 逆转录和 PCR 反应可在同一管内连续进行, 不用额外的开管、移液等操作, 大大提高了检测通量, 并能有效防止污染。本产品可以对扩增产物进行实时检测, 极大地提高了检测灵敏度, 并且省略了 PCR 反应后的电泳步骤, 非常适合于一些微量 RNA 的检测。本制品整合了 ABScript II Reverse Transcriptase 和 *Taq* DNA Polymerase 的优势, 配合优化的缓冲体系后, 扩增效率和特异性进一步加强, 能稳定高效的进行一步法 RT-qPCR 反应。

### 产品规格及组分

组分	20 RXN (50 $\mu$ L/RXN)	100 RXN (50 $\mu$ L/RXN)
2X One Step RT-qPCR Probe Buffer *	500 $\mu$ L	1.25 mL X 2
One Step Probe HS <i>Taq</i>	20 $\mu$ L	100 $\mu$ L
ABScript II RT Enzyme Mix**	20 $\mu$ L	100 $\mu$ L
50X ROX Dye I ***	20 $\mu$ L	100 $\mu$ L
50X ROX Dye II ***	20 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	500 $\mu$ L	1.25 mL X 2

\*, 注: 含有 dNTPs, Mg<sup>2+</sup> 等。

\*\* , 注: 含有 ABScript II Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor。

\*\*\*, 注: 用于校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

保存条件: -20°C

### ROX Dye 适用机型

#### 50X ROX Dye I

ABI 7300 Real-Time PCR System, ABI Step One, ABI Step One Plus 等。

#### 50X ROX Dye II

ABI 7500 / 7500 Fast Real-Time PCR System, Stratagene Mx3000 / Mx3005P 等。

#### NO ROX Dye

Roche LightCycler480, Roche LightCycler96, Bio-Rad CFX96 等。

### 注意事项

1. 2X One Step RT-qPCR Probe Buffer 在使用前请充分融解、混匀, 避免强光直射。若同时需要配制多个 One Step RT-qPCR 反应时, 应配制各种试剂的混合液, 然后再分装到每个反应管, 减少试剂损失。
2. 试剂盒中的 ABScript II RT Enzyme Mix、One Step Probe HS *Taq* 含有高浓度甘油, 在使用前请轻轻混匀, 避免起泡; 分取之前应先混匀并离心, 使用后立即放回 -20°C 冰箱保存。
3. 反应液的配制和分装建议使用无污染的头、Microtube, 尽量避免污染。
4. 为保证反应的成功, 建议使用高质量的 RNA 模板。
5. 本试剂盒只能使用基因特异性引物, 不能使用随机引物或 Oligo dT 引物等进行反应。
6. 设计一步法 RT-qPCR 实验的扩增引物时, 推荐扩增子在 70-200 bp, 效果最佳。

# 操作说明

## 实验准备

- 1.5 mL RNase-free EP 管、RNase-free PCR 管、移液器和枪头、冰盒或冰。
- PCR 探针、引物与模板。
- 荧光定量 PCR 专用管或平板。

## 实验方法

用户需自备的试剂：RNA 模板、引物、探针。请按照不同品牌荧光定量 PCR 仪的使用说明书进行实验操作。

### 1. One Step RT-qPCR 反应

推荐冰上配制反应体系。

推荐的反应体系

组分	加入量 (20 $\mu$ L 体系)	加入量 (50 $\mu$ L 体系)
2X One Step RT-qPCR Probe Buffer	10 $\mu$ L	25 $\mu$ L
One Step Probe HS Taq	0.4 $\mu$ L	1 $\mu$ L
ABScript II RT Enzyme Mix	0.4 $\mu$ L	1 $\mu$ L
正向引物(10 $\mu$ M) *	0.4 $\mu$ L	1 $\mu$ L
反向引物(10 $\mu$ M) *	0.4 $\mu$ L	1 $\mu$ L
TaqMan Probe (10 $\mu$ M) **	0.4 $\mu$ L	1 $\mu$ L
50X ROX Dye I	0.4 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Total RNA ***	2 $\mu$ L	5 $\mu$ L
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	to 20 $\mu$ L	to 50 $\mu$ L

\*, 注：通常引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 时可以得到较好的结果，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。扩增产物的长度建议在 70-200 bp 范围内。

\*\*, 注：探针浓度可在 50-250 nM 内进行调整。

\*\*\*, 注：建议 20  $\mu$ L 体系中加入 15 pg-150 ng 的 Total RNA 为模板。

推荐的反应程序

步骤	温度	时间	循环数 (Cycles)
逆转录	42°C	5 min	1
预变性	95°C	3 min	1
循环反应	95°C	5-15 s	40
	60°C	30-34 s *	

\*, 注：延伸时间根据 qPCR 仪所需数据采集时间自行调整：如使用 StepOnePlus 时设定为 30 s；使用 7300 时设定为 31 s；使用 7500 时设定为 34 s。

反应结束后确认扩增曲线，进行标准曲线制作等。

## 2. 试验示例

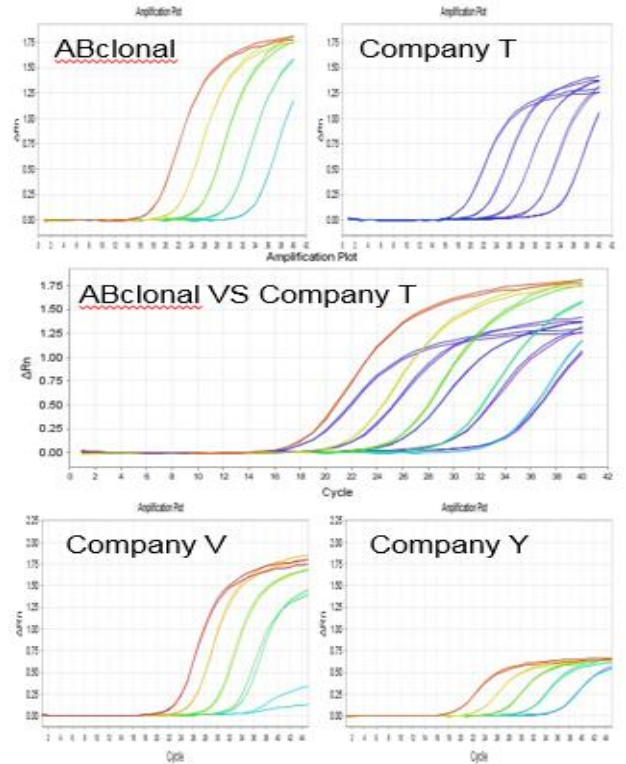


图 1：以大鼠 RNA 为模板(150 ng 为起始量)，5'端 VIC 荧光标记探针，10 倍梯度稀释，能很好的检测出目的基因，同其他厂家产品相比具有较高的检测灵敏性。

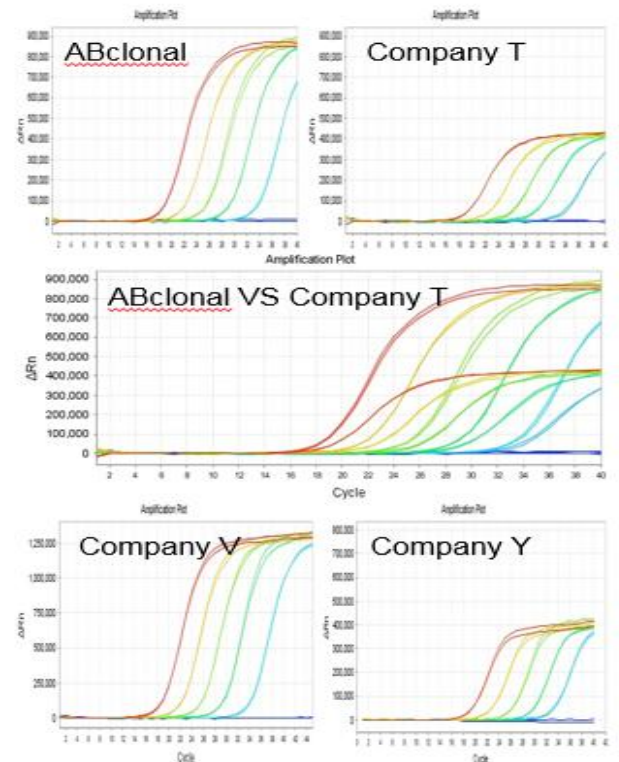


图 2：以大鼠 RNA 为模板(150 ng 为起始量)，5'端 FAM 荧光标记探针，10 倍梯度稀释，能很好的检测出目的基因，同其他厂家产品相比具有较高的检测灵敏性。