



RT-PCR Easy™ I (One Step)

One-step RT-PCR Master Mix

RT-PCR Easy™ II (Two Step)

Two-step RT-PCR Master Mix

RT-qPCR Easy™ I (One Step)-SYBR Green I

One-step Real-Time RT-PCR Master Mix

RT-qPCR Easy™ II (One Step)-Taqman

One-step Real-Time RT-PCR Master Mix

Research use only

Store at -20°C



目 录

产品介绍	3
产品特点	3
试剂盒应用	4
产品质量控制	4
试剂盒内容	5
试剂盒组分信息	6
Foregene Reverse Transcriptase	6
Foregene HotStar Taq DNA Polymerase	6
运输及储存条件	7
注意事项	7
RNA 模板浓度	8
操作前准备事项	9
实验材料和设备	9
自备试剂	9
安全性	9
操作指南	10
RT-PCR Easy™ I(One Step)操作步骤	10
RT-PCR Easy™ II(Two Step)操作步骤	12
RT-qPCR Easy™ I(One Step)-SYBR 操作步骤	15
RT-qPCR Easy™ II(One Step)-Taqman 操作步骤	18
RT-qPCR Easy™ I(One Step)-SYBR Green I 实例	21
操作示意图	23
RT-PCR 操作示意图	23
RT-qPCR 操作示意图	24
问题分析指南	25

产品介绍

Foregene One-Step RT-PCR Easy 系列产品实现了从 RNA 到双链 DNA 的一体化反应，即逆转录和 PCR 扩增在同一个反应离心管、同一个反应体系中完成，简化了实验步骤、提高了实验效率、优化了实验方案。

RT-PCR Easy™ I(One Step)是 Foregene 公司特别研制的一步法 RT-PCR 试剂盒，实现了从 RT 到 PCR 的同一管中连续进行，操作简单、快捷，能有效的减少实验过程中的污染。2x RT-PCR Easy™ Mix 具有很强的耐受性、热稳定性、高效特异性扩增。

RT-PCR Easy™ II(Two Step) 包含两步法 RT-PCR 的全部试剂，采用 Foregene 公司独特的 RT Mix，能简便高效的合成高质量的第一链 cDNA， 2x PCR Easy™ Mix Plus 具有高效的特异性扩增，两者的有效的结合为客户提供使实验更加方便

RT-qPCR Easy™ I (One Step)-SYBR Green I采用独特的体系使得 RT 和 Real Time PCR 反应有效的结合起来，能快速完成基因的定量检测。该产品具有很强的耐受性，高效的特异性和稳定性。产品包含了本公司特有的 Foregene HotStar Taq DNA Polymerase，该酶相对于普通 Taq 酶具有扩增速度快（2Kb/min）、扩增效率高、特异性扩增能力强、错配率低等优点。在此用于 Real Time RT-PCR 可减少非特异性扩增，提高 PCR 的准确性。

RT-qPCR Easy™ II (One Step)-Taqman 采用了 Foregene HotStar Taq DNA Polymerase，优化的 Taqman qPCR 体系，可以快速特异的对 RNA 模板进行 Real Time RT-PCR 定量检测。

产品特点

- ◆ 一步法试剂盒使逆转录和 PCR 两种反应在同一管中进行，只需要加入模板 RNA、特异性 PCR 引物和 RNase-Free ddH₂O 即可。
- ◆ 可以快速准确的对 RNA 进行实时定量分析。RT-qPCR Easy™(One Step)试剂盒可以快速、高效的对病毒 RNA 或微量 RNA 进行定量分析。
- ◆ 试剂盒使用独特的 Foregene 反转录试剂和 Foregene HotStar Taq DNA Polymerase 相结合，并配合独特的反应体系，有效提高反应的扩增效率和特异性。
- ◆ 优化的反应体系使得反应具有更高的检测灵敏性，更强的热稳定性，更好的耐受性。
- ◆ RT-qPCR Easy™ I (One Step)-SYBR Green I和RT-qPCR Easy™ II (One

Step)-Taqman试剂盒附带有ROX内参染料，可用于消除信号本底及孔间信号误差，方便客户用于不同型号的定量PCR仪。

试剂盒应用

RT-PCR Easy™ I(One Step)

- ◆ 高拷贝、低拷贝基因的快速检测。
- ◆ 高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板。

RT-PCR Easy™ II(Two Step)

- ◆ 方便快捷，可广泛用于cDNA的克隆，基因的检测等分子实验。
- ◆ 高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板。

RT-qPCR Easy™ I (One Step)-SYBR Green I

- ◆ 可以快速、准确地对RNA病毒等微量RNA进行分析。
- ◆ 高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板。

RT-qPCR Easy™ II (One Step)-Taqman

- ◆ 可以快速、准确地对RNA病毒等微量RNA进行分析。
- ◆ 高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板。

产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System), 每一批次的 RT-PCR Easy 和 RT-qPCR Easy 系列试剂盒都严格进行多次测试，确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

试剂盒内容

RT-PCR Easy™ I (One Step)

试剂盒组成	RT-02011	RT-02012
	100 次 (20 μ l 体系)	500 次 (20 μ l 体系)
2x RT-PCR Easy™ Mix	1ml	1.7mlx3
RNase-Free ddH ₂ O	1.7ml	1.7mlx3
说明书	1 份	1 份

RT-PCR Easy™ II (Two Step)

试剂盒组成	RT-02021	RT-02022
	100 次 (20 μ l 体系)	500 次 (20 μ l 体系)
2x RT Easy™ Mix	1ml	1.7mlx3
2x PCR Easy™ Mix Plus	1ml	1.7mlx3
Random Primer (50 μ M)	200 μ l	1ml
Oligo(dT)18 Primer (50 μ M)	200 μ l	1ml
RNase-Free ddH ₂ O	1.7ml	1.7ml
说明书	1 份	1 份

RT-qPCR Easy™ I (One Step)-SYBR Green I

试剂盒组成	RT-02111	RT-02112
	100 次 (20 μ l 体系)	500 次 (20 μ l 体系)
2x RT-qPCR Easy™ Mix-SYBR	1ml	1.7mlx3
RNase-Free ddH ₂ O	1.7ml	1.7mlx3
50x ROX Reference Dye	200 μ l	1ml
说明书	1 份	1 份

RT-qPCR Easy™ II (One Step)-Taqman

试剂盒组成	RT-02131	RT-02132
	100 次 (20 μ l 体系)	500 次 (20 μ l 体系)
2x RT-qPCR Easy™ Mix-Taqman	1ml	1.7mlx3
RNase-Free ddH ₂ O	1.7ml	1.7mlx3
20x ROX Reference Dye	100 μ l	0.5ml
说明书	1 份	1 份

试剂盒组分信息

- ◆ 2x RT Easy™ Mix: Foregene Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、dNTPs、反应缓冲液、优化剂和稳定剂。
- ◆ 2x PCR Easy™ Mix Plus : Foregene Taq DNA Polymerase、dNTPs、Mg²⁺、反应缓冲液、优化剂、稳定剂。
- ◆ 2x RT-PCR Easy™ Mix: Foregene Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、Foregene HotStar Taq DNA Polymerase、dNTPs、Mg²⁺、反应缓冲液、优化剂、稳定剂。
- ◆ 2x RT-qPCR Easy™ Mix-SYBR: Foregene Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、Foregene HotStar Taq DNA Polymerase、优化配比的 dNTPs、SYBR GreenI、Mg²⁺、稳定剂、增强剂、优化剂。
- ◆ 2x RT-qPCR Easy™ Mix-Taqman: Foregene Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、Foregene HotStar Taq DNA Polymerase、优化配比的 dNTPs、Mg²⁺、稳定剂、增强剂、优化剂。

Foregene Reverse Transcriptase

Foregene 逆转录酶能够提供高效、特异性强的逆转录反应。逆转录酶表现出很高的亲和力，并在 50°C 反应温度甚至 65°C 条件下仍然保持良好的逆转录活性，能够很好的逆转录其他逆转录酶不能处理的二级结构复杂的 RNA。Foregene Reverse Transcriptase 灵敏度高，使用的 RNA 量范围广泛（0.1pg≤RNA≤1μg）。

Foregene HotStar Taq DNA Polymerase

提供了 PCR 的高度特异性扩增。反转录进行时，DNA 聚合酶是完全无效的，不妨碍反转录反应。后通过 PCR 反应程序，加热到 94°C，激活 DNA 聚合酶同时，失活逆转录酶。热启动过程消除了第一个循环时非特异性退火的引物和引物二聚体的形成，保证 PCR 扩增的高度特异性和可靠性。

运输及储存条件

1. 运输条件

- ◆ 全程低温冰盒运输，保证试剂盒处于 $< 4^{\circ}\text{C}$ 状态。

2. 保存条件

- ◆ RT-PCR EasyTM I/II 保存于 -20°C 。产品收到后立即存放于 -20°C 恒温冰箱中。如果存储条件适当，产品在 1 年有效期内不会降低任何性能。
- ◆ RT-qPCR EasyTM I/II 保存于 -20°C 。产品收到后立即存放于 -20°C 恒温冰箱中。如果存储条件适当，产品在 1 年有效期内不会降低任何性能。2x RT-qPCR EasyTM Mix-SYBR 组分含有 SYBR Green I，请避光保存。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 试剂应避免反复冻融，否则会导致试剂性能下降或失效。
- ◆ RT-qPCR EasyTM I 试剂盒里面的试剂请避光 -20°C 保存。
- ◆ 建议使用新鲜样品提取或 -80°C 条件下保存的模板 RNA (RNA 应避免反复冻融)。
- ◆ 为避免 RNase 污染，实验操作请在 RNase-Free 空间进行；所用的枪头、PCR tube 都必须保证是 RNase-Free 的；并佩戴一次性手套和口罩。
- ◆ 本试剂盒必须配合特异引物进行实验，请根据实验需要选择需要扩增的基因的特异引物。
- ◆ 使用前，将 Mix 置于冰上使其完全融化，轻弹混匀后使用；体系的配制请在冰浴上操作，以提高试剂盒性能，提高 PCR 扩增的特异性。2x RT-qPCR EasyTM Mix-SYBR 应避免强光照射。

模板 RNA 浓度

RT-PCR Easy™ I(One Step): 0.1pg-1μg

RT-PCR Easy™ II(Two Step): 0.1pg-5μg

RT-qPCR Easy™ I (One Step)-SYBR Green I: 0.1pg-100ng

RT-qPCR Easy™ II (One Step)-Taqman: 1pg-100ng

操作前准备事项

强烈建议用户在本试剂盒使用前仔细阅读说明书。RT-PCR Easy 系列试剂盒操作简单、方便、快捷，说明书提供了整个试剂盒的正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

实验材料和设备

- ◆ 常规PCR仪或荧光定量PCR扩增仪
- ◆ 微量移液器和RNase-Free枪头
- ◆ Real Time PCR专用管子或平板
- ◆ 冰浴

自备试剂

- ◆ RNA模板
- ◆ 基因特异PCR引物

安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。

操作指南

Protocol For RT-PCR Easy™ I(One Step)

A：材料及试剂准备

1. 准备制备好的 RNA 模板（建议使用 Foregene Total RNA Isolation Kit 系列试剂盒提取纯化 RNA）、特异引物(10 μ M)及相关的耗材、仪器。

注意：请确保 RNA 的完整性，尽量使用新鲜样品提取的 RNA。

2. 将 2 \times RT-PCR Easy™ Mix、RNase-Free ddH₂O 置于冰浴上，使其自然融化，并轻弹管壁混匀待用。

B：RT-PCR 体系配制

2 \times RT-PCR Easy™ Mix使用方便快捷，最大程度上避免操作过程中的污染以及多次配制反应体系带来的实验误差。使用时只需取反应体系一半体积（如：反应体系为20 μ l，则取10 μ l 2 \times RT-PCR Easy™ Mix溶液），加入适量的RNA模板和特异性引物，并加 RNase-Free ddH₂O补足体积。具体的RT-PCR反应体系配制可参考下表1。

表 1：RT-PCR 体系配制

RT-PCR 体系添加内容	用 量		终 浓 度
2 \times RT-PCR Easy™ Mix	10 μ l	25 μ l	1 \times
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	1 μ l	0.2-0.25 μ M *
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	1 μ l	0.2-0.25 μ M *
Template(RNA)	X μ l	X μ l	0.1pg-1 μ g
RNase-FreeddH ₂ O	(9-X) μ l	(23-X) μ l	
Total Volume	20 μ l	50 μ l	

*：通常引物终浓度为 0.2-0.25 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1-0.5 μ M 范围内调整引物浓度。

注意：Forward Primer 和 Reverse Primer 为目的基因的特异性引物。

C：RT-PCR 反应程序设置

1. 参照上表配制好 RT-PCR 体系后，轻轻混匀（可使用枪头轻轻吹打；也可在涡旋仪

上混匀并瞬时离心收集散落在管壁或管盖的液体，放置于冰盒上待用)。

2. 参照 RT-PCR 反应程序设置（表 2）设置反应的温度、时间等。

注意：为了保证 Mix 的活性和提高其扩增效率，最好在设置好 PCR 仪程序之后再
进行 RT-PCR 反应体系的配制，以便体系配制完成后立即进入反应程序。

表 2：RT-PCR 反应程序设置

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	50°C	10-30min	1	逆转录
2	94°C	5min	1	预变性
3	94°C	10sec	30-40	变性
4	55-65°C	20sec		退火
5	72°C	Xmin (2kb/min)		延伸
6	72°C	5min	1	终延伸

注意：以上程序仅作参考，实际反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。对具有复杂二级结构的 RNA 模板，第一步逆转录的反应温度建议使用 65°C。在具体操作中需要根据目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，延伸时间等。

Protocol For RT-PCR Easy™ II(Two Step)

A : cDNA 合成 (RNA 逆转录步骤)

A-1 : 材料及试剂准备

1. 准备制备好的 RNA 模板（建议使用 Foregene Total RNA Isolation Kit 系列试剂盒提取纯化 RNA）、特异引物(10 μ M)及相关的耗材、仪器。

注意：请确保 RNA 的完整性，尽量使用新鲜样品提取的 RNA。

2. 将 2 \times RT Easy™ Mix、RNase-Free ddH₂O 置于冰浴上，使其自然融化，并轻弹管壁混匀待用。

A-2 : RT 体系配制

2 \times RT Easy™ Mix使用方便快捷，最大程度上避免操作过程中的污染以及多次配制反应体系带来的实验误差。使用时只需取反应体系一半体积（如：反应体系为20 μ l，则取10 μ l 2 \times RT Easy™ Mix溶液），加入RNA模板和逆转录引物，并加RNase-Free ddH₂O 补足体积20 μ l。具体的RT反应体系配制可参考下表3。

表 3 : RT 体系配制

RT-PCR 体系添加内容	用 量
2 \times RT Easy™ Mix	10 μ l
Random Primer(50 μ M)	1 μ l
or Oligo(dT)18 Primer(50 μ M)	1 μ l
or Specific Primer(2 μ M)	1 μ l
Template(RNA)	X μ l (Total RNA: <5 μ g/mRNA: <0.5 μ g)
RNase-Free ddH ₂ O	(9-X) μ l
Total Volume	20 μ l

A-4 : RT 反应程序设置

1. 参照上表配制好 RT 体系后，轻轻混匀（可使用枪头轻轻吹打；也可在涡旋仪上瞬时混匀并瞬时离心收集散落在管壁或管盖的液体，放置于冰盒上待用）。

2. 参照 RT 反应程序设置（表 4）设置反应的温度、时间等。

注意：为了保证 Mix 的活性和提高其扩增效率，最好在待金属浴达到设置的反应温度（逆转录温度 50°C 或 65°C）之后再行 RT 反应体系的配制，以便体系配制完成后立即进入反应程序。也可以在 PCR 仪上进行 RT 反应。

表 4：RT 反应程序设置

步骤	温度	时间	内容
1	50°C 或 65°C	20 min	复性（逆转录）
2	85°C	5min	失活

注意：使用 Random primer 时，在第一步反应前，应先进行 25°C，10min 预热反应。以上程序仅作参考，实际反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。对具有复杂二级结构的 RNA 模板，第一步反应温度建议使用 65°C。

3. 反应产物可直接用于后续试验，或储存 -20°C 长达一周。长期储存建议 -70°C 条件下，避免反复冻融。

B：PCR 鉴定反应

B-1：PCR 反应体系配制

使用 A 步骤合成的 cDNA 作为模板，配合试剂盒中提供的 2x PCR Easy™ Mix Plus 进行 PCR 反应。将 2x PCR Easy™ Mix Plus、cDNA、RNase-Free ddH₂O 置于冰浴上，使其自然融化，并轻弹管壁混匀待用。具体的 PCR 体系配制参照下表 5。

表 5：PCR 反应体系配制

RT-PCR 体系添加内容	用量	终浓度
2x PCR Easy™ Mix Plus	10μl	1x
Forward Primer (10μM)	0.5μl	0.2-0.25μM 1*
Reverse Primer (10μM)	0.5μl	0.2-0.25μM 1*
Template(cDNA)	Xμl	1-2μl
RNase-Free ddH ₂ O	(9-X)μl	
Total Volume	20μl	

1*：通常引物终浓度为 0.2-0.25μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1-0.5μM 范围内调整引物浓度。

B-2 : PCR 反应条件设置

1. 参照上表配制好 PCR 体系后，轻轻混匀（可使用枪头轻轻吹打；也可在涡旋仪上瞬时混匀并瞬时离心收集散落在管壁或管盖的液体，放置于冰盒上待用）。
2. 参照 PCR 反应程序设置（表 6）设置反应的温度、时间等。

注意：为了保证 PCR Mix 的活性和提高其扩增效率，最好先在 PCR 仪上设置好 PCR 条件，在进行 PCR 体系的配制。

表 6 : PCR 反应条件设置

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	94°C	5min	1	预变性
2	94°C	10sec	30-40	变性
3	55-65°C	20sec		退火
4	72°C	Xmin (2kb/min) 1*		延伸
5	72°C	5min	1	终延伸

1*：根据扩增的目的片段长度设定具体的时间，Foregene Taq DNA Polymerase 的扩增速度为 2kb/min。

注意：PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。对具有复杂二级结构的 RNA 模板，建议第一步逆转录的反应温度使用 65°C。在具体操作中，需要根据目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，延伸时间等。

Protocol For RT-qPCR Easy™ I(One Step)-SYBR Green I

A : 材料及试剂准备

1. RNA 模板(建议使用 Foregene Total RNA Isolation Kit 系列试剂盒提取纯化 RNA)、特异引物(10 μ M)及相关的耗材、仪器。

注意: 请确保 RNA 的完整性, 尽量使用新鲜样品提取的 RNA。

2. 将 2 \times RT-qPCR Easy™ Mix-SYBR、RNase-Free ddH₂O 置于冰上, 使其自然融化, 并轻弹管壁混匀待用。

B : RT-qPCR 体系配制

2 \times RT-qPCR Easy™ Mix-SYBR 使用方便快捷, 最大程度上避免操作过程中的污染以及多次配制反应体系带来的实验误差。使用时只需取反应体系一半体积(如: 反应体系为 20 μ l, 则取 10 μ l 2 \times RT-qPCR Easy™ Mix-SYBR 溶液), 加入 RNA 模板和特异性引物, 并加 RNase-Free ddH₂O 补足体积。具体的 RT-qPCR 反应体系配制可参考下表 7。

表 7 : RT-qPCR 体系配制

RT-PCR 体系添加内容	用 量	终 浓 度
2 \times RT-qPCR Easy™ Mix-SYBR	10 μ l	1 \times
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2-0.25 μ M 1*
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2-0.25 μ M 1*
Template(RNA)	X μ l	0.1pg-100ng
50 \times ROX Reference Dye	-	2*
RNase-FreeddH ₂ O	(9-X) μ l	
Total Volume	20 μ l	

1*: 通常引物终浓度为 0.2-0.25 μ M 可以得到较好结果。反应性能较差时, 可以在 0.1-0.5 μ M 范围内调整引物浓度。

注意: Forward Primer 和 Reverse Primer 为目的基因的特异性引物。

2*: 根据定量 PCR 仪器不同选择合适终浓度的 ROX Reference Dye。常见定量 PCR 仪的最适 ROX Reference Dye 浓度见下表:

定量 PCR 仪	ROX Reference Dye 终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/Step One 等	5 \times (如 20 μ l 体系, 加入 2 μ l 50 \times ROX Reference Dye)

ABI 7500、7500 Fast、Stratagene Mx3000P、Mx3005P 和 Mx4000 等	1× (如 20μl 体系, 加入 0.4μl 50×ROX Reference Dye)
Roche PCR 仪、Bio-Rad PCR 仪、Eppendorf 定量 PCR 仪等	不用添加 ROX Reference Dye

C : RT-qPCR 反应程序设置

1. 参照上表配制好 RT-qPCR 体系后, 轻轻混匀 (可使用枪头轻轻吹打; 也可在涡旋仪上混匀并瞬时离心收集散落在管壁或管盖的液体, 放置于冰盒上待用)。
2. 参照下面 RT-qPCR 反应程序设置反应的温度、时间等。

注意: 为了保证 Mix 的活性和提高其扩增效率, 最好在设置好 PCR 仪程序之后再
进行 RT-qPCR 反应体系的配制, 以便体系配制完成后立即进入反应程序。

为了得到最佳的PCR效果, 针对不同的模板、不同的引物可采用梯度PCR优化反应条件。

注意: 本试剂盒的提供的Foregene Hotstar Taq DNA Polymerase延伸温度范围为:
60-72°C, 最佳延伸温度为72°C。

下面为RT-qPCR反应条件举例, 建议采用两步法进行PCR反应。当出现模板浓度过低引起非特异扩增时, 引物T_m值较低导致扩增效率低或扩增曲线重复性不佳等现象时, 建议尝试三步法进行PCR反应。RT-qPCR反应条件设置参考表8 (两步法)、表9 (三步法)。

表 8 : RT-qPCR 反应程序设置 (两步法)

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	50°C	10 min	1	逆转录
2	94-95°C	5min	1	预变性
3	94-95°C	10sec	30-45	循环中模板变性
	60-65°C	20sec*		退火/延伸

表9：RT-qPCR反应程序设置（三步法）

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	50°C	10 min	1	逆转录
2	94-95°C	5min	1	预变性
3	94-95°C	10sec	30-45	循环中模板变性
	55-65°C	20sec		引物退火
	72°C	20-30sec 1*		延伸

1*：根据扩增的目的片段长度设定具体的时间，Foregene HotStar Taq DNA Polymerase 的扩增速度为 2kb/min。

注意：PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。对具有复杂二级结构的 RNA 模板，建议第一步逆转录的反应温度使用 65°C。在具体操作中，需要根据目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，延伸时间等。

Protocol For RT-qPCR Easy™ II(One Step)-Taqman

A : 材料及试剂准备

1. RNA 模板(建议使用 Foregene Total RNA Isolation Kit 系列试剂盒提取纯化 RNA)、特异引物、特异荧光探针 Probe 及相关的耗材、仪器。

注意: 请确保 RNA 的完整性, 尽量使用新鲜样品提取的 RNA。

2. 将 2x RT-qPCR Easy™ Mix-Taqman、RNase-Free ddH₂O 置于冰上, 使其自然融化, 并轻弹管壁混匀待用。

B : RT-qPCR 体系配制

2x RT-qPCR Easy™ Mix-Taqman 使用方便快捷, 最大程度上避免操作过程中的污染以及多次配制反应体系带来的实验误差。使用时只需取反应体系一半体积(如: 反应体系为 20μl, 则取 10μl 2x RT-qPCR Easy™ Mix-Taqman 溶液), 加入 RNA 模板和特异性引物, 并加 RNase-Free ddH₂O 补足体积。具体的 RT-qPCR 反应体系配制可参考下表 10。

表10 : RT-qPCR体系配制

RT-PCR 体系添加内容	用 量	终 浓 度
2x RT-qPCR Easy™ Mix-Taqman	10μl	1x
Forward Primer(10μM)	0.8μl	50-900nM
Reverse Primer(10μM)	0.8μl	50-900nM
Probe(4μM)	1μl	200nM
Template(RNA)	Xμl	0.1pg-100ng
20x ROX Reference Dye	-	*
RNase-FreeddH ₂ O	(7.4-X)μl	
Total Volume	20μl	

注意: Forward Primer 和 Reverse Primer 为目的基因的特异性引物。qPCR 体系可以根据实验需要和 PCR 型号进行调节。大多数引物的终浓度, 我们推荐 400nM。特异引物和 Probe 的用量请根据配制的浓度按照我们推荐的终浓度自行调整用量。50μl 体系的 qPCR, 请参照 20μl 体系按比例调整试剂用量。

*: 根据定量 PCR 仪器不同选择合适终浓度的 ROX Reference Dye。常见定量 PCR 仪的最适 ROX Reference Dye 浓度见下表:

定量 PCR 仪	ROX Reference Dye 终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/Step One 等	1× (如 20μl 体系, 加入 1μl 20×ROX Reference Dye)
ABI 7500、7500 Fast、Stratagene Mx3000P、Mx3005P 和 Mx4000 等	0.5× (如 20μl 体系, 加入 0.5μl 20×ROX Reference Dye)
Roche PCR 仪、Bio-Rad PCR 仪、Eppendorf 定量 PCR 仪等	不用添加 ROX Reference Dye

C : RT-qPCR 反应程序设置

- 参照上表配制好 RT-qPCR 体系后, 轻轻混匀 (可使用枪头轻轻吹打; 也可在涡旋仪上混匀并瞬时离心收集散落在管壁或管盖的液体, 放置于冰盒上待用)。
- 参照下面 RT-qPCR 反应程序设置反应的温度、时间等。

注意: 为了保证 Mix 的活性和提高其扩增效率, 最好在设置好 PCR 仪程序之后再进行 RT-qPCR 反应体系的配制, 以便体系配制完成后立即进入反应程序。

为了得到最佳的 PCR 效果, 针对不同的模板、不同的引物可采用梯度 PCR 优化反应条件。

注意: 本试剂盒的提供的 Foregene Hotstar Taq DNA Polymerase 延伸温度范围为: 60-72°C, 最佳延伸温度为 72°C。

下面为 RT-qPCR 反应条件举例, 建议采用两步法进行 PCR 反应。当出现模板浓度过低引起非特异扩增时, 引物 T_m 值较低导致扩增效率低或扩增曲线重复性不佳等现象时, 建议尝试三步法进行 PCR 反应。RT-qPCR 反应条件设置参考表 11 (两步法)、表 12 (三步法)。

表 11 : RT-qPCR 反应程序设置 (两步法)

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	50°C	10 min	1	逆转录
2	94-95°C	5min	1	预变性
3	94-95°C	10sec	30-45	循环中模板变性
	60-65°C	20sec 1*		退火/延伸

表12：RT-qPCR反应程序设置（三步法）

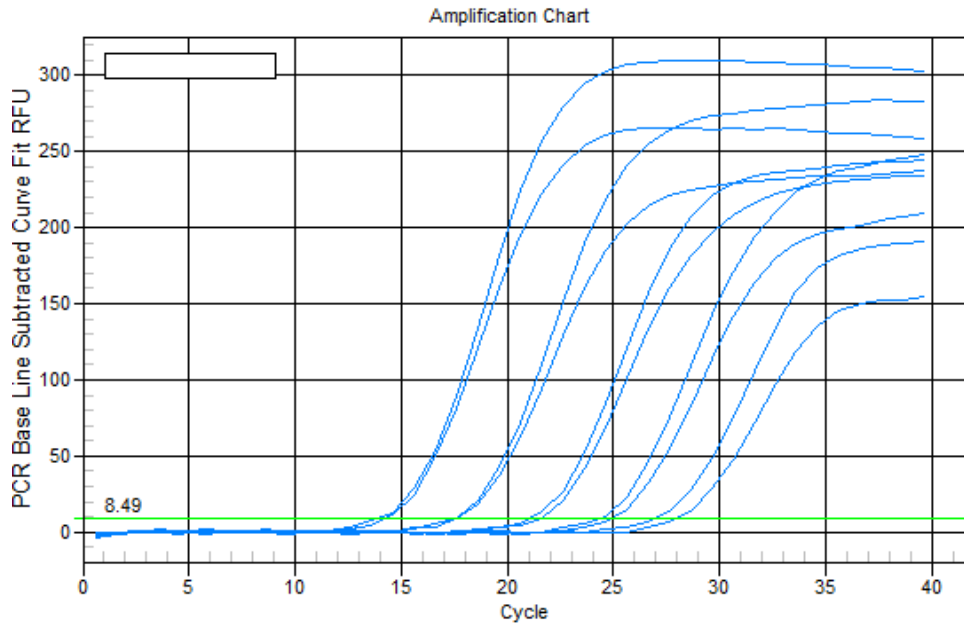
步骤	温度	时间	循环数	内容
1	50°C	10 min	1	复性
2	94-95°C	5min	1	预变性
3	94-95°C	10sec	30-45	循环中模板变性
	55-65°C	20sec		引物退火
	72°C	20-30sec 1*		延伸

1*：根据扩增的 DNA 片段长度设定具体的时间，Foregene HotStar Taq DNA Polymerase 的扩增速度为 2kb/min。

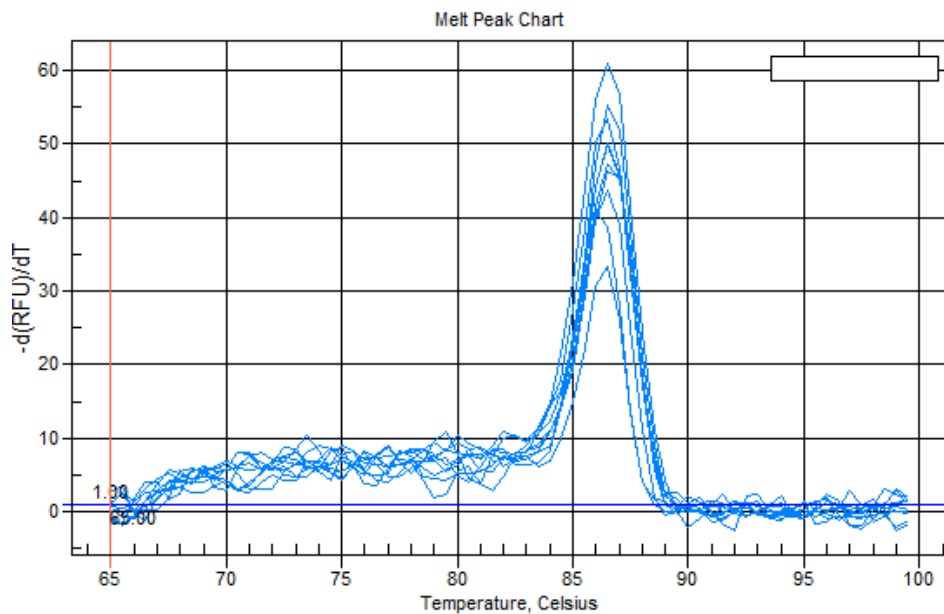
注意：PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。对具有复杂二级结构的 RNA 模板，建议第一步逆转录反应温度使用 65°C。在具体操作中，需要根据目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，延伸时间等。

RT-qPCR Easy™ I(One Step)-SYBR Green I 实例

本实验是直接采用一步法 RT-qPCR，从 Human 239T 细胞中所提取的 Total RNA 10pg~100 ng 为模板，检测 *gapdh* 基因的表达量。

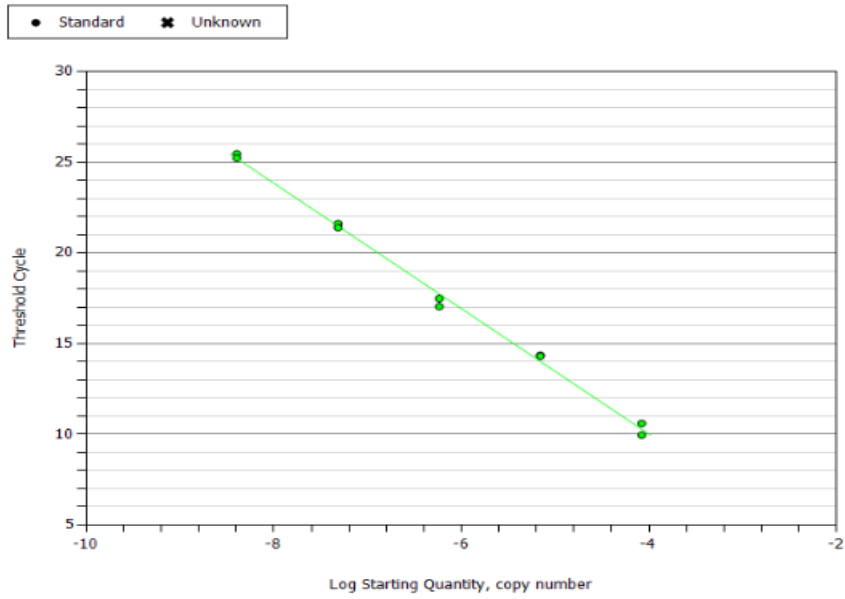


扩增曲线图



溶解曲线图

反应结束后，各扩增曲线的 Ct 值，制作标准曲线。



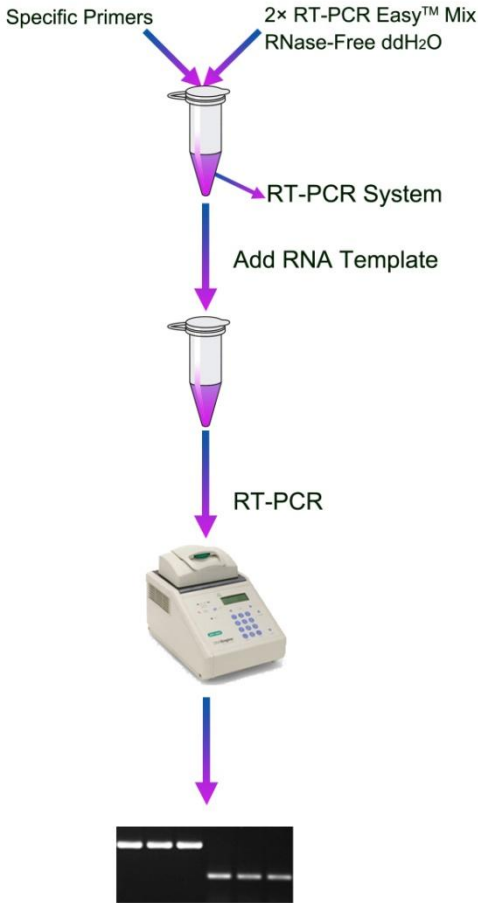
FAM Efficiency (%)=94.6 R²=0.996 Slope-3.457

标准曲线图

通过上述实验检测 10 pg~100 ng Total RNA 中的目的基因。分析融解曲线可知，无论哪一种浓度的模板都能够得到单一的 PCR 特异性产物。同时定量曲线的线性关系良好，在实验浓度范围内能够准确的进行。

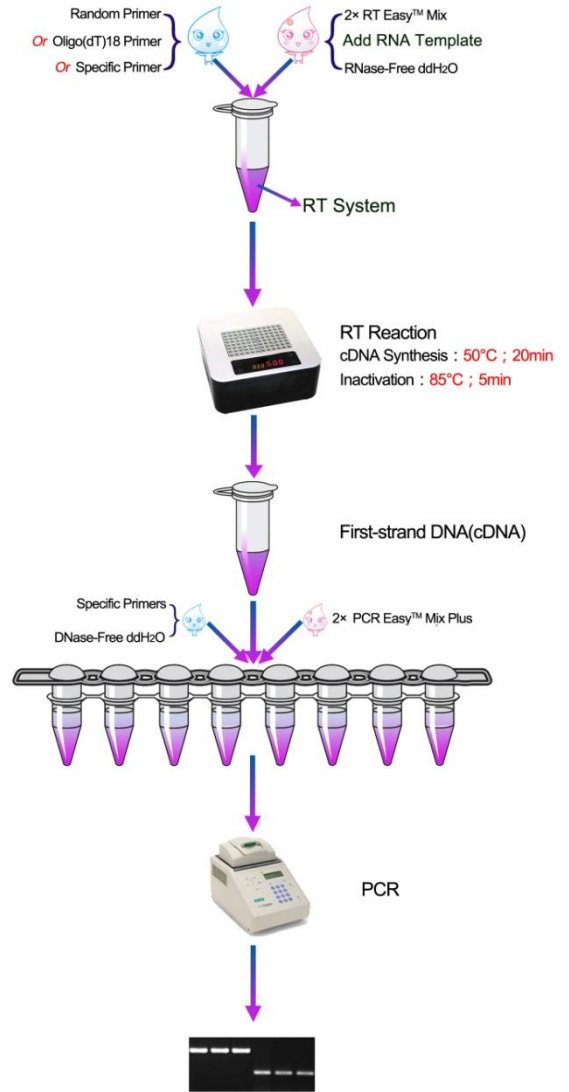
RT-PCR 操作示意图

RT-PCR(One Step)



琼脂糖凝胶电泳分析RT-PCR结果

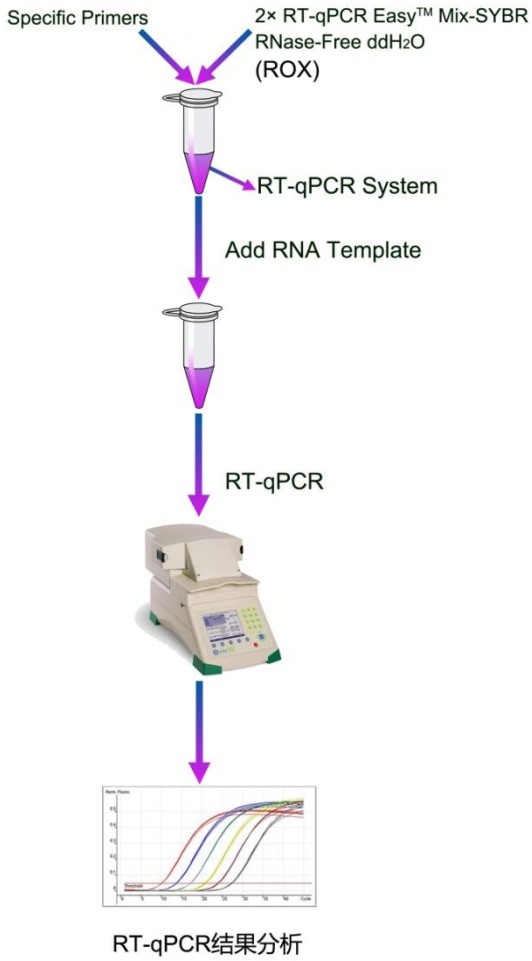
RT-PCR(Two Step)



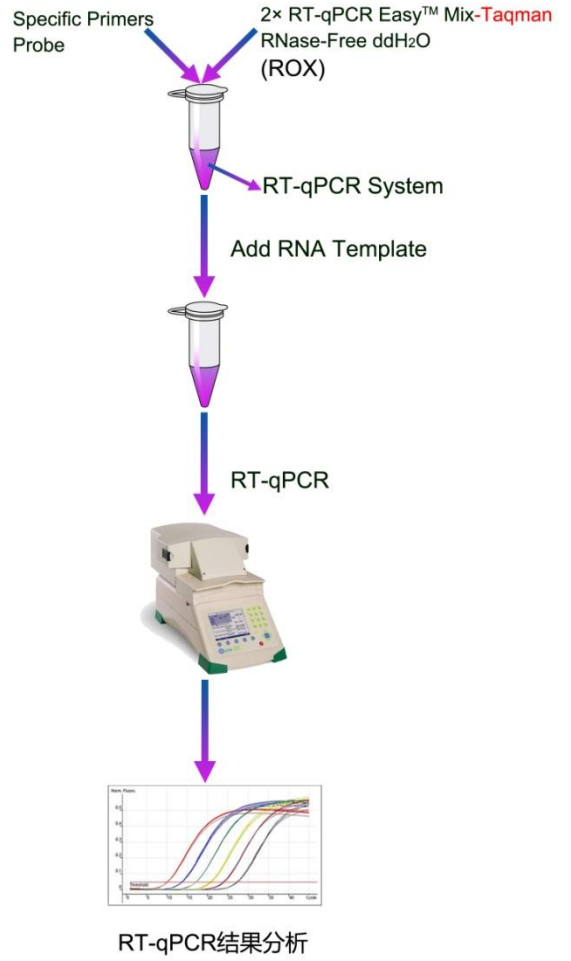
琼脂糖凝胶电泳分析PCR结果

RT-qPCR 操作示意图

RT-qPCR(SYBR Green I)



RT-qPCR(Taqman)



问题分析指南

以下针对 RT-PCR Easy 系列试剂盒实用中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-66070618 或 E-mail：Tech@foregene.com。

RT-PCR 未出现目的片段

1. 模板 RNA 被降解

建议：使用新鲜样品提取，应用高质量高纯的 RNA（建议使用 Foregene Total RNA Isolation Kit 系列提取纯化 RNA）；-80℃ 储存的 RNA 应避免反复冻融。

2. RNA 含有抑制剂

建议：逆转录抑制剂一般包括 SDS、胍盐、EDTA 等，建议通过 70% 的乙醇对 RNA 沉淀进行清洗，除去抑制剂；或使用 Foregene Total RNA Isolation Kit 系列提取纯化 RNA。

3. 引物设计问题

建议：按照引物设计原则，重新设计引物进行检查。

出现引物二聚体或非特异性扩增

1. RNA 中有基因组 DNA 污染。

建议：使用扩增级的 DNase I 进行处理，设置没有逆转录的对照检测 DNA 污染。

2. Mg²⁺浓度不适合。

建议：我们提供的 Mix 中 Mg²⁺浓度为 3.5 mM。但针对有些特殊引物和模板可能需要较高浓度的 Mg²⁺，因此可直接添加 MgCl₂ 进行 Mg²⁺浓度的优化，建议每次增加 0.5mM 的 Mg²⁺进行优化。

3. PCR 退火温度过低。

建议：对引物做梯度 PCR，选择合适的退火温度。

4. PCR 产物太长。

建议：荧光定量 PCR 产物长度最好在 100-300bp 之间。

5. 引物出现降解，引物降解会导致非特异性扩增出现。

建议：可使用 SDS-PAGE 电泳检测引物是否降解，更换新的引物进行实验。

6. PCR 体系不当，或体系太小。

建议：PCR 反应体系太小会导致检测精度降低。最好使用定量 PCR 仪推荐的反应体系重新进行实验。

7. PCR 循环数过多。

建议：适当降低 PCR 循环次数。

无扩增信号

1. 试剂盒保存不当导致 SYBR Green I 失效或者试剂盒过期导致 SYBR Green I 荧光信号丢失。

建议：2x RT-qPCR Easy™ Mix-SYBR 试剂要-20℃避光保存，且避免反复冻融。

2. RNA 模板中存在大量酶抑制因子。

建议：重新纯化模板或降低模板的使用量。

3. PCR 扩增条件不适合、引物序列或者浓度不当。

建议：确认引物序列的正确性以及引物没有降解；扩增信号不好时，可尝试降低退火温度，适当调整引物浓度等。

4. 模板用量问题，太少或过多。

建议：可进行模板线性化梯度稀释，选择 PCR 效果最好的模板浓度进行荧光定量实验。

负对照出现过高的荧光值

1. 在操作过程中导致的试剂污染。

建议：更换新的试剂进行 RT-PCR 实验。

2. PCR 反应体系配制时发生污染。

建议：操作时进行必要的防护措施，比如：戴乳胶手套，使用带滤芯的枪头等。

3. 引物出现降解，引物降解会导致非特异性扩增出现。

建议：可使用 SDS-PAGE 电泳检测引物是否降解，更换新的引物进行 RT-PCR 实验。

定量值重复性差

1. 仪器故障。

建议：PCR 仪的每一个 PCR 孔之间可能存在误差，在温度管理或检测时产生重现性较差现象。请根据相应仪器的说明书进行检测。

2. 样品纯度不好。

建议：样品不纯会导致实验的重复性较差，这包括模板、引物的纯度。最好进行模板的再纯化，引物最好使用 SDS-PAGE 纯化。

3. PCR 体系配制放置时间过长。

建议：RT-PCR 体系配制好后立即用于 PCR 实验，不要搁置太长时间；建议先设置到 PCR 程序后再进行 RT-PCR 体系配制。

4. PCR 扩增条件不适合、引物序列或者浓度不当。

建议：确认引物序列的正确性以及引物没有降解；扩增信号不好时，可尝试调整退火温度，适当调整引物浓度等。

中国·福际 World's Foregene

成都福际生物技术有限公司

电话: 028-83360257, 028-83361257

传真: 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

