

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 | 25μl 体系 | 50μl 体系 | 终浓度 |
|-----------------------------|-----------|---------|-----------|
| 25×One Step RTase mix | 1 | 2 | 1× |
| 5×One Step RT Premix Buffer | 5 | 10 | 1× |
| Primer 1 (10μM) | 0.5-2.5μl | 1-5μl | 0.2~1.0μM |
| Primer 2 (10μM) | 0.5-2.5μl | 1-5μl | 0.2~1.0μM |
| TaqMan Probe | - | - | 0.1~0.5μM |
| RNA | - | - | - |
| ddH ₂ O | - | - | - |
| Total volume | 25μl | 50μl | |

- 1、通常引物终浓度为 0.2μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1~1.0μM 范围内调整引物浓度；
- 2、通常探针浓度可在 0.1~0.3μM 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。

5×One Step RT Premix (Probe qRT-PCR)

货号: T2210

试剂组成:

25×One Step RTase mix

5×One Step RT Premix Buffer

规格: 50T

保存: -20℃保存长期保存, 使用前应混匀, 避免反复冻融。

产品说明:

One Step RT Premix (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:

One Step RT Premix 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'→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℃ 20 分钟;

变 性: 95℃ 3 分钟;

变 性: 95℃ 10~20 秒;

退火/延伸: 60℃ 20~60 秒。 } 35~50 个循环