

TaqMan One Step RT-qPCR Kit

产品货号: T11239

产品规格: 50T/200T

产品介绍:

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。

试剂组成:

25×One Step RT-qPCR RTase mix
5×One Step RT-qPCR Buffer
10×Enhancer

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'→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°C 20分钟;

变 性: 95°C 3分钟;

变 性: 95°C 10~20秒;

退火/延伸: 60°C 20~60秒 } 35~50 个循环



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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 RT-qPCR RTase mix	1	2	1×
5×One Step RT-qPCR Buffer	5	10	1×
Primer 1 (10μM)	0.5-2.5μl	1-5μl	0.2~0.4μM
Primer 2 (10μM)	0.5-2.5μl	1-5μl	0.2~0.4μM
TaqMan Probe	-	-	0.1~0.5μM
10×Enhancer	2.5μl	5μl	1×
RNA	1-2μl	2-4μl	-
ddH ₂ O	-	-	-
Total volume	25μl	50μl	

- 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；
- 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；
- 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：

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

技术说明：

- 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；
- 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；
- 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。

保存：

-20℃保存长期保存，使用前应混匀，避免反复冻融。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com