

# 一步法RT-qPCR检测试剂盒（探针法）

## One-Step RT-qPCR Kit (TaqMan)



### 产品规格

产品货号	组分			可检测 96 孔板孔数	可检测 384 孔板孔数
	细胞裂解液	扩增缓冲液	扩增酶		
PCR002.100	5 ml	1 ml	400 $\mu$ l	100 wells	500 wells
PCR002.500	25 ml (5 $\times$ 5 ml)	5 ml (5 $\times$ 1 ml)	2 ml (5 $\times$ 400 $\mu$ l)	500 wells	2,500 wells
PCR002.1000	50 ml (10 $\times$ 5 ml)	10 ml (10 $\times$ 1 ml)	4 ml (10 $\times$ 400 $\mu$ l)	1,000 wells	5,000 wells

### 产品描述

RT-qPCR 广泛应用于基因表达检测与定量分析。传统 RT-qPCR 方法，即使采用一步法，仍需进行样本 RNA 提取，操作繁琐，影响因素多，检测通量低。One-Step RT-qPCR Kit (TaqMan) 是一种免提取 (extraction-free) 的一步法 RT-qPCR 检测试剂盒。使用该试剂盒时，细胞洗涤后直接加入裂解液裂解，以裂解液为模板进行 RT-qPCR 扩增。从细胞准备到 PCR 结束可在两小时内完成，操作标准化，显著缩短检测时间，减少影响因素，提升检测通量。

本试剂盒采用探针法 (TaqMan probe)。正式检测前需优化验证 PCR 参数，确保检测特异性和灵敏度。试剂盒未包含 DNA 酶处理步骤，因 DNA 酶处理可能存在消化不完全和灭活不完全的问题，残留 DNA 模板和 DNA 酶活性可能影响后续定量分析。因此，引物设计时应以 RNA 序列为依据，确保引物的最 3 末端的最 2 至 5 个碱基与其 5 末端一侧的其余碱基分布在不同外显子上，使扩增系统只能以 RNA 为模板进行扩增。

欣博盛生物的一步法 RT-qPCR 检测试剂盒（探针法）(One-Step RT-qPCR Kit, TaqMan) 经过优化验证，避免非特异性产物生成。无需核酸提取、离心和 DNA 酶处理，操作便捷，检测灵敏度高。

### 实验步骤

1. 细胞准备：待检测孔的细胞数目需要在 25-15000 个的范围内。贴壁细胞吸去培养液后，用室温的 DMEM 无血清培养液洗涤一次，弃去洗涤液，加细胞裂解液。悬浮细胞离心吸去培养液后，用室温的 DMEM 无血清培养液洗涤一次，弃去洗涤液后，加细胞裂解液。
2. 细胞裂解：96 孔培养板每孔加 50  $\mu$ l 细胞裂解液，384 孔培养板每孔加 10  $\mu$ l 细胞裂解液，轻拍培养板数次，室温振摇 10-15 分钟。细胞裂解产物 (lysate) 使用完之后需要尽快放回 2~8 $^{\circ}$ C 保存，低温保存时间不超过 8 小时。不建议长期保存细胞裂解产物。
3. RT-qPCR 准备：按下列次序准备 20  $\mu$ l 反应体系：  
20  $\mu$ l 反应体系中细胞裂解产物不建议超过 2  $\mu$ l。

组分	体积 ( $\mu$ L)
扩增缓冲液	10
扩增酶 mix 试剂	4
引物 mix	2
细胞裂解产物模板	2
无酶水	2

4. RT-qPCR 扩增：逆转录 42~50°C, 20~30 分钟，然后 95°C 1 分钟。qPCR 参数需要根据特定的目标基因及引物序列的预实验结果确定。以下是一个 housekeeping 基因的扩增设定，供参考：

#### 逆转录：

45°C, 20分钟；然后95°C 1分钟。

#### PCR扩增：

94°C 20秒, 56°C 20秒, 65°C 20秒（收集荧光信号），35-40个循环；然后72°C 3分钟。

5. 必要时进行熔解曲线分析。

6. 结果分析。

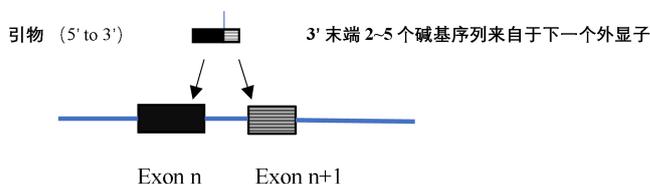
## 保存条件

-20°C或-80°C保存。

## 注意事项

1. 引物设计：需要以RNA序列为依据，扩增产物至少覆盖2个外显子，确保扩增系统不能以基因组DNA为模板进行扩增，而只能以RNA为模板进行扩增。在下列情况下可以实现：

- 2个外显子之间的内含子比较长，以基因组为模板的扩增长度明显超出系统中的聚合酶在扩增延伸时间内所能完成的扩增长度；
- 2个外显子之间的内含子比较短，但至少有一条引物的最3末端2至5个碱基与其5末端一侧的其余碱基分布在不同的外显子上且与邻近内含子5末端碱基序列不同（参考下图），使得以DNA为模板的扩增成为不可能。



2. 探针设计：探针长度18~28个碱基， $T_m$ 比引物高8~10 °C，不含3个以上连续的G，5末端不是G。探针5末端带荧光基团，3末端带淬灭基团。

3. PCR扩增参数及体系：任何一个PCR的任何一对扩增引物，都需要经过预实验，以确定最佳扩增温度与时间设定，引物量，酶量，甚至 $Mg^{2+}$ 浓度调整，这对检测特异性与灵敏度非常重要。需要做类似细胞数梯度检测预实验，在获得良好的线性关系之后再开始微孔板高通量实验。

2. 熔解曲线：熔解曲线分析可以完美地区分特异性的与非特异性的扩增。熔解曲线分析在预实验实验参数确定过程中就需要使用。荧光探针扩增体系做熔解曲线前需要在扩增完成后加入双链DNA结合的荧光染料（如SYBR Green），标记在探针上的荧光染料不能用于熔解曲线分析。

3. 试验中请穿着试验服并带手套做好防护工作。请按实验室安全操作规范进行实验。

4. 本试剂**仅供科研使用**，请勿用于临床诊断或其他治疗用途。

V08/25