

EZProbe One Step qRT-PCR Kit

说明书

Cat. No.: EZB-RTProbe

一、产品简介

EZProbe One Step qRT-PCR Kit 是专门以 RNA 为模板进行探针法定量 PCR 检测的试剂盒。本试剂盒含有四管试剂：10× EZProbe One Step Enzyme Mix、2× EZProbe One Step Buffer、ROX1 和 ROX2，使逆转录和 qPCR 反应在同一个反应体系中完成，不需要额外的开管和移液，这大大提高了检测的通量、降低了检测的时间及污染的风险。

本试剂盒的 10× EZProbe One Step Enzyme Mix 包含 M-MLV 突变体逆转录酶、热启动 DNA 聚合酶和 RNase Inhibitor，2× EZProbe One Step Buffer 包含 dNTPs 及高度优化的缓冲液体系，使之具备了更强的扩增效率、抗干扰能力，检测灵敏度可达到 0.1 pg 总 RNA 或低至 10 拷贝的靶基因。同时，本试剂盒中含有两管 ROX 参比染料，适用于任何仪器类型；使用时，只需在配制的反应体系中加入模板 RNA、探针和引物，再加水至指定体积即可，十分便于使用。

二、产品组分

组分	EZB-RTProbe-R2-S (100 Rxns, 20 µl/Rxn)	EZB-RTProbe-R2 (500 Rxns, 20 µl/Rxn)
10× EZProbe One Step Enzyme Mix*1	200 µl	1 ml
2× EZProbe One Step Buffer*2	1 ml	5 ml
50× ROX Reference Dye 1*3	44 µl	220 µl
50× ROX Reference Dye 2*3	44 µl	220 µl

*1. 包含 M-MLV 突变体逆转录酶，RNase Inhibitor 和热启动 DNA 聚合酶。*2. 包含 dNTPs 及高度优化的缓冲液。*3. 用于校正不同孔之间的荧光信号误差。

三、保存条件

本试剂盒建议置于-20°C 避光保存。过期日期详见产品标签中有效期信息。

四、适用的仪器型号 (请根据仪器型号选择合适的 ROX)

Do Not Use ROX	Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; Roche LightCycler™ 96, Roche LightCycler™ 480; Eppendorf Mastercycler® ep realplex, realplex 2s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Thermo Scientific PikoReal Cyler; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®; Bioer Linegene 9600; HONGSHI SLAN®-96P.
Use ROX1 (1×)	ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOne Plus™.
Use ROX2 (1×)	ABI 7500, 7500 Fast, Quant-Studio 1, 3, 5, 6, 7, 12K Flex, Dx, ViiA™7; Stratagene MX4000™, MX3000P™, MX3005P™.

五、注意事项

1. 10× EZProbe One Step Enzyme Mix 试剂含有高浓度的甘油，使用前请充分混匀后再短暂离心至管底。
2. 反应液的配制请使用 RNase-free 或者灭过菌的枪头、EP 管等，尽量避免污染。
3. RNA 的质量对 qPCR 的结果具有很大的影响，因此应尽量保证 RNA 不降解，通常建议 RNA 提取后尽快进行逆转录，且避免反复冻融。如果提取的 RNA 不立即使用，建议保存在 -80°C 冰箱。

六、操作步骤

1. 使用前，将 10× EZProbe One Step Enzyme Mix、2× EZProbe One Step Buffer、ROX、Probe、引物对和 RNA 模板从冰箱中取出，冰上放置 5 ~ 10 min 或用手紧握试剂管使之充分融化，上下颠倒 5 ~ 10 次充分混匀（非常重要），然后使用离心机短暂离心至管底，放在冰上备用。
2. 按照如下表格进行逆转录和 qPCR 一步反应体系的配制（为了使加样误差降低到最低，一般建议将 Total RNA 和 ddH₂O 配制成预混液，10× EZProbe One Step Enzyme Mix、2× EZProbe One Step Buffer、ROX、Probe 和引物对配制成预混液，分别混匀后再依次加入到每个反应孔中；或者根据个人熟练掌握的加样方式进行加样）：

成分	10 µl 体系	20 µl 体系
Total RNA	40 ng (0.5 pg ~ 50 ng)	80 ng (1 pg ~ 100 ng)
10× EZProbe One Step Enzyme Mix	1 µl	2 µl
2× EZProbe One Step Buffer	5 µl	10 µl
Probe*1 (10 µM)	0.1 µl	0.2 µl
Forward Primer (10 µM)	0.2 µl	0.4 µl
Reverse Primer (10 µM)	0.2 µl	0.4 µl
ROX (50×, 根据仪器型号选择)	0.2 µl	0.4 µl
ddH ₂ O (灭过菌)	补足到 10 µl	补足到 20 µl

注：*1. 关于探针浓度：探针的终浓度可以在 50 ~ 250 nM 之间调整；*2. 关于引物浓度：通常引物终浓度为 0.2 µM 即可得到较好的扩增效果，也可以根据情况在 0.1 ~ 1.0 µM 范围内调整引物终浓度。

3. 加样完成后，盖上封板膜并封紧，将孔板放入干净的自封袋或保鲜袋中，再用一块孔板架倒置压住封板膜，Vortex 30 sec，或用力上下颠倒各 20 次充分振荡孔板，以使液体充分混匀，用离心机 1000 rpm 离心 1 min，将液体离心至 qPCR 孔板底部。

4. qRT-PCR 反应程序如下（建议打开仪器自带的探针法模板程序，并在此模板上根据下表进行调整）：

Step	1	2	3	
	逆转录反应	热启动酶活化*1	PCR 反应	
			循环数 (40 cycles)	
			解链	退火&延伸 (采集荧光信号)*2
温度	42°C	95°C	95°C	60°C
时间	5 min	5 min	10 sec	30 sec
体积	10 µl/ 20 µl			

注意：*1. 95°C 反应 5 min 的目的是活化热启动酶，该步骤为必须步骤，因此不能省略。*2. 在退火&延伸这一步骤需要进行荧光信号的采集。*3. 不需要跑熔解曲线程序。

七、关于 qPCR 反应是否良好的判断

① 扩增曲线呈典型的 S 型曲线，荧光背景信号阶段、荧光信号指数扩增阶段及平台期均完整可见，内参 Ct 值在合理范围内（通常在 13~22 之间，典型的内参 Ct 值在 15~20 之间），则可认为该反应正常；② 同一个模板和引物的重复孔的 Ct 值相差 0.5 以内。同时满足以上两个条件的可以认为数据可用。