



BlazeTaq™ Probe One-Step RT-qPCR Kit

—探针一步法 RT-qPCR 检测试剂

With ROX Reference Dye	Without ROX Reference Dye
Cat.No. QP076 (20 µl × 200 reactions)	Cat.No. QP086 (20 µl × 200 reactions)
Cat.No. QP077 (20 µl × 600 reactions)	Cat.No. QP087 (20 µl × 600 reactions)
Cat.No. QP078 (20 µl × 1200 reactions)	Cat.No. QP088 (20 µl × 1200 reactions)

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
翔泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
网址: www.genecopoeia.com
www.igenebio.com

使用手册

BlazeTaq™ Probe One-Step RT-qPCR Kit

- I. 产品介绍
- II. 相关产品
- III. 试剂盒组份
- IV. 实验前准备
- V. 实验步骤
- VI. 实验案例
- VII. 查错指南
- VIII. 使用许可与质量保证

I. 产品介绍

BlazeTaq™ Probe One-Step RT-qPCR Kit 是以 RNA 为模板的 Real Time PCR 反应试剂盒。本试剂盒以基因特异性引物为逆转录和 PCR 扩增引物，将逆转录反应和定量检测在同一反应管内完成，操作简便，并可有效降低污染的风险。试剂盒包含了性能优异的逆转录酶，以及含有热启动 Taq DNA 聚合酶、dNTP 和必需的 Buffer 成分混合而成的 5× 预混液，广泛适用于主流的仪器平台。

BlazeTaq™ Probe One-Step RT-qPCR Kit 使用 BlazeTaq RTase Mix 将 RNA 逆转录 cDNA，并使用抗体修饰的 Taq DNA 聚合酶进行 Real Time PCR 反应，抗体的完全封闭有效避免了聚合酶在热循环反应前被激活，抑制了在低温条件下由引物产生的非特异性退火或引物二聚体引起的非特异性扩增。另外，经优化的 Buffer 体系大大提高了 PCR 反应的扩增效率和特异性，且检测灵敏度可达 0.1 pg 总 RNA，适用于各类型 RNA 模板的检测和多重 PCR 探针法。

II. 相关产品

GeneCopoeia 提供一套用于基因功能研究的完整解决方案，其相关产品如下表所示。

产品	描述
BlazeTaq™ SYBR® Green qPCR mix 2.0	抗体修饰型 SYBR Green 染料法基因定量检测试剂
SureScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit	用于将 mRNA 逆转录成第一链 cDNA
All-in-One™ qPCR Primers	高特异、高灵敏度的基因特异验证引物
ExProfile™ Gene qPCR Arrays	预制和定制的基因表达量定量检测阵列
All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit	用于将 miRNA 逆转录成第一链 cDNA
All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit	SYBR Green 染料法 miRNA 定量检测试剂
All-in-One™ miRNA qPCR Primers	高特异、高灵敏度的 miRNA 特异验证引物
miProfile™ miRNA qPCR Arrays	预制和定制的 miRNA 表达量定量检测阵列
RNAzol® RT RNA Isolation Reagent	用于分离 mRNA, microRNA 或 total RNA

III. 试剂盒组份

BlazeTaq™ Probe One-Step RT-qPCR Kit (试剂盒对应货号为 QP076, QP077, QP078) 组份如下表所示。

组份货号	组份	体积	储存条件
QP076-01	Probe One Step RT-qPCR Mix (5×)	1×800 μL 3×(1×800 μL) 6×(1×800 μL)	-20°C 至少保存 12 个月, 请注意避免反复冻融
QP076-02	BlazeTaq™ One Step RTase Mix (50×)	1×80 μL 3×(1×80 μL) 6×(1×80 μL)	-20°C 至少保存 12 个月, 请注意避免反复冻融
QP001-02	ROX Reference Dye (30 μM)	1×80 μL 3×(1×80 μL) 6×(1×80 μL)	-20°C 避光, 至少保存 12 个月, 请注意避免反复冻融

BlazeTaq™ Probe One-Step RT-qPCR Kit (without ROX) (试剂盒对应货号为 QP086, QP087, QP088) 组份如下表所示。

组份货号	组份	体积	储存条件
QP076-01	Probe One Step RT-qPCR Mix (5×)	1×800 μL 3×(1×800 μL) 6×(1×800 μL)	-20°C 至少保存 12 个月, 请注意避免反复冻融
QP076-02	BlazeTaq™ One Step RTase Mix (50×)	1×80 μL 3×(1×80 μL) 6×(1×80 μL)	-20°C 至少保存 12 个月, 请注意避免反复冻融

需用户自备的材料和仪器

- RNA 模板
- 特异性正、反向引物, 检测用探针
- ddH₂O (无核酸酶)
- PCR 管或微量离心管 (用于 qPCR 反应体系的准备)
- qPCR 反应管或平板(Rnase-free)
- 微量移液器及灭菌枪头
- 微量离心机
- qPCR 仪

IV. 实验前准备

操作前请仔细阅读本说明书。

注意！ 在处理化学制品前，请穿戴实验服、一次性手套和护目镜。

RNA 样品的准备

避免溶剂、耗材及实验器具中污染 RNase，对于 RNA 相关实验是至关重要的。在准备 RNA 样品全过程中，需要戴上口罩和手套。请规范按照所选的 RNA 提取流程进行操作。实验中可购买无 RNase 的即用型试剂进行实验，或者将溶剂用 0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）处理后再经过高压灭菌亦可。实验器具上的 RNase 可经过 250°C 干热灭菌 3 小时灭活。包括微量离心管、移液器吸头等全部耗材用 DEPC 处理后，再经过高压灭菌以灭活 RNase 方可使用，同样可购买无 RNase 的耗材产品使用。

注意事项:

1. 为保证使用效果，试剂盒保存于 -20 °C，避免储存或放置于 4°C 或室温条件下。注意避光保存。
2. 试剂解冻后请轻柔颠倒离心管数次以使试剂混合均匀，避免产生泡沫，短暂离心后备用。
3. 实验流程中需保证使用 DNase Free 的灭菌超纯水。
4. RT-qPCR 是一种灵敏的 RNA 检测方法。请注意在冰上进行操作，并严格参考推荐的实验流程，以降低 RNA 样本降解的风险。
5. 应在 RT-qPCR 反应结束时分析扩增曲线和熔解曲线，以评估扩增特异性。

V. 实验步骤

1. 将试剂盒中的 Probe One Step RT-qPCR Mix (5×) 及其它组份至于室温解冻，短暂离心使管中试剂集中于底部，然后迅速置于冰上保存。根据定量 PCR 仪器需求，选择是否使用 ROX Reference Dye。

注： Probe One Step RT-qPCR Mix (5×) 可能出现黄色沉淀，不影响正常使用。解冻过程中轻柔振荡混匀，或者在 37°C 孵育 5~10 分钟，使沉淀完全溶解。

2. 按照下表内容，在冰上准备 RT-qPCR 反应液。注意提前准备无 RNase 的 PCR 管或平板并置于冰上预冷。

BlazeTaq™ Probe One-Step RT-qPCR Kit 使用说明书

试剂	体积 ^a	终浓度
Probe One Step RT-qPCR Mix (5×)	4 μL	1×
BlazeTaq™ RTase Mix (50×)	0.4 μL	1×
PCR forward primer (10 μM) ^b	0.4 μL	0.2 μM ^c
PCR reverse primer (10 μM)	0.4 μL	0.2 μM
Probe (10 μM) ^d	0.2 μL	0.1 μM
RNA 模板 ^e	5 μL	
ROX Reference Dye ^f (30 μM), <i>optional</i>	0.4 -0.1 μL	600 nM~150 nM
dd H ₂ O	to 20 μL	

- a. 本试剂盒已针对 20 μL 反应体系做了优化。如果总的 RT-qPCR 反应体系发生变化，对应的反应体系中各试剂体积需要做相同比例的调整。
- b. 引物是确保一步法 RT-qPCR 成功的重要因素之一。GeneCopeia 的 All-in-One™ 人类、小鼠和大鼠等物种的引物均已通过验证，即使在低拷贝数基因的情况下也能提供特异性和灵敏的扩增。此外，为了设计您自己的引物，您可以选择使用 Oligo 引物分析软件（Molecular Biology Insights）或 Primer Premier 软件（Premier Biosoft International）。
- c. qPCR 引物反应终浓度一般介于 0.2 ~0.6 μM 之间。通常 PCR 反应体系中引物的终浓度为 0.2 μM 时，可以获得比较好的实验结果。如果 qPCR 扩增效率比较低，可以适当地提高引物使用浓度，但是过高的引物浓度可能会降低 qPCR 扩增特异性。
- d. 探针浓度与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参考仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行。一般在 50-250 nM 之间调整。
- e. 本试剂盒对 RNA 模板的检测范围可达到 1 pg - 100 ng 总 RNA，具体取决于目标 RNA 的丰度及质量。然而为保险起见，用于检测的总 RNA 量尽量控制在 1 ng - 10 ng 范围内。通常可用 260 nm 的 UV 光度计对 RNA 模板进行定量，并可使用 Bioanalyzer 或琼脂糖凝胶电泳等方法分析 RNA 模板的质量。
- f. ROX Reference Dye 仅在 BlazeTaq™ Probe One-Step RT-qPCR Kit（货号 QP075, QP076, QP077）中提供，用于校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。不同的定量 PCR 仪使用的 ROX Reference Dye 浓度不同，因此，根据不同的定量 PCR 仪器，选择使用不同浓度的 ROX Reference Dye。常见的定量 PCR 仪，使用 ROX Reference Dye 参考如下：

仪器类型	ROX 使用量（20 μL 体系）	终浓度
BioRad iCycler, MyiQ, iQ5, CFX-96, CFX-384, Eppendorf Mastercycler realplex, Roche LightCycler 480, LightCycler 2.0	None	No ROX
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT and 7900HTFast, ABI Step One, ABI Step One Plus	0.4 μL (0.2-0.4 μL)	600 nM (300-600 nM)
ABI 7500, 7500 Fast, ABI ViiA7, Stratagene Mx3000P, Mx3005P, Mx4000,	0.1 μL (0.02-0.1 μL)	150 nM (30-150 nM)

BlazeTaq™ Probe One-Step RT-qPCR Kit 使用说明书

注：其他未列在上表中的定量 PCR 仪器类型，请根据仪器的使用说明书摸索合适的 ROX Reference Dye。

g. 按实验需求准备如下对照组：

No-RT controls: 为检测 RNA 样本中是否有基因组 DNA 的污染，在反应体系中不需加入 BlazeTaq RTase Mix (50×)。

No-template controls: 为检测反应体系中是否有基因组 DNA 的污染，在反应体系中不需加入 RNA 样本。

3. 按照反应体系说明将各组分加入 PCR 反应管或平板中，短暂离心确保预混反应液充满 PCR 反应管或平板底部。

4. 根据下表设置 RT-qPCR 程序进行反应

循环数	步骤	温度	时间	检测与否
1	逆转录	50°C	10 min	否
1	预变性	95°C	30 sec	否
40	变性	95°C	10 sec	否
	延伸	60°C	30 sec	是

注意事项

- 50°C 的逆转录温度对于此逆转录酶是最佳的，但也可根据实验要求在 42-50°C 之间调整。
- 通常情况下使用默认推荐的 60°C 作为反应体系中的延伸温度即可。如需调整延伸温度可根据引物的 Tm 值在 60 - 65°C 范围内进行调整。
- qPCR 扩增产物的长度一般为 80~150 bp 之间，个别情况下扩增产物的长度达到 500 bp 也是可以接受的，请根据扩增产物的长度适当延长延伸的时间。另外，部分仪器由于硬件或控制用的软件等特殊原因，延伸时间无法设定为 15 秒，此时请根据仪器的使用说明书，设定最适的可设定时间（如 Applied Biosystems 7000/7300 为 31 秒以上，7500 为 32 秒以上）。

VI. 实验案例

案例：以 HeLa 细胞 RNA 为模板，进行三重 PCR 反应，检测的靶基因 RNA 为 ACTB、GADPH 和 B2M

实验仪器：Roche LightCycler 480-2 Real Time qPCR

实验过程：

- 将总 RNA 进行 10 倍梯度稀释，共 6 个梯度浓度，得到的总 RNA 量范围为 100 ng-1 pg。
- 按照如下表格所示，在冰上配制 RT-qPCR 反应预混液。

试剂	体积
Probe One Step RT-qPCR Mix (5×)	4 μL
BlazeTaq™ RTase Mix (50×)	0.4 μL
each of PCR forward primer (10 μM)	0.5 μL
each of PCR reverse primer (10 μM)	0.5 μL
each of Probe(6uM)	0.5 μL
ddH ₂ O	to 15 μL

- 轻柔混匀 RT-qPCR 预混液，并短暂离心。
- 每个 PCR 反应管中分别加入 5 μL 梯度稀释的总 RNA，使用 5 μL ddH₂O 作为无模板对照（NTC 组）。
- 根据下表设置 RT-qPCR 程序：

循环数	步骤	温度	时间	检测与否
1	逆转录	50°C	10 min	否
1	预变性	95°C	30sec	否
40	变性	95°C	10 sec	否
	延伸	60°C	30 sec	是

6. qPCR 结果分析：扩增曲线

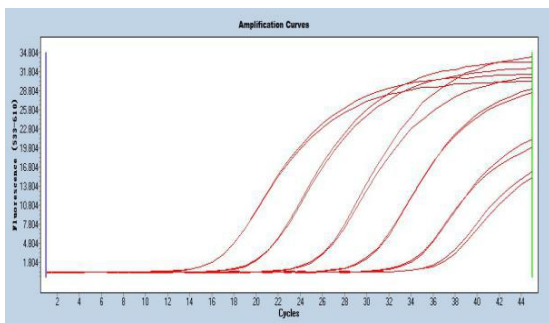


图 1: ACTB 扩增曲线图

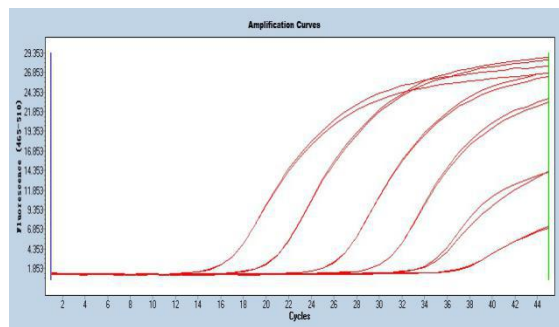


图 2: GAPDH 扩增曲线图

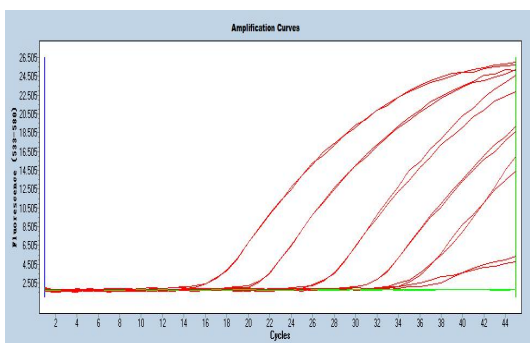


图 3: B2M 扩增曲线图

7. qPCR 结果分析：标准曲线分析。

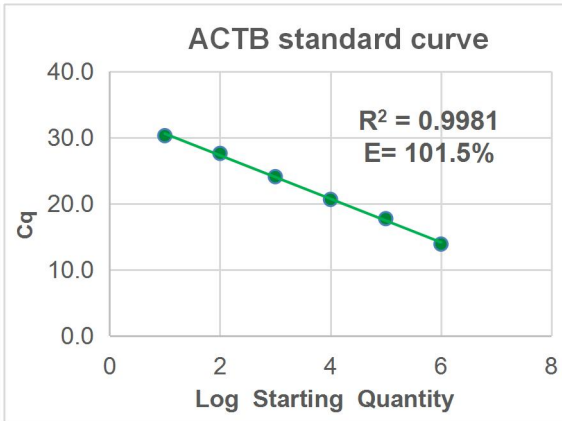


图 4: ACTB 扩增产物标准曲线图

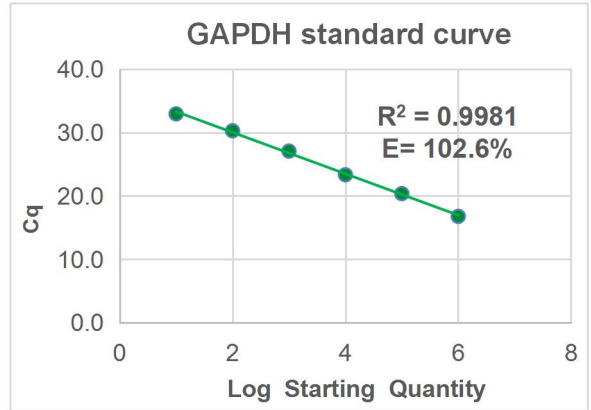


图 5: GAPDH 扩增产物标准曲线图

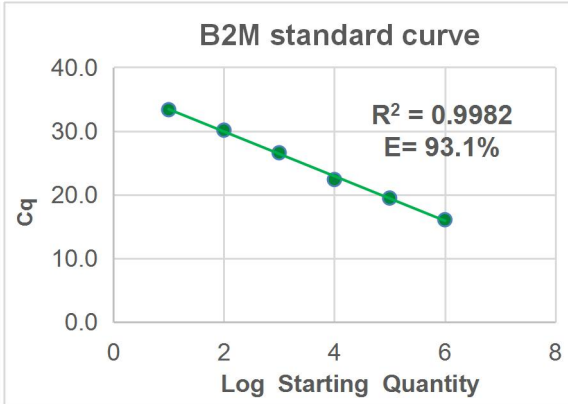


图 6: B2M 扩增产物标准曲线图

8. **结论:** 以 HeLa 细胞提出的总 RNA 为模板, 使用本试剂产品进行扩增灵敏度检测, 通过结合分析扩增曲线和标准曲线, 显示 BlazeTaq™ Probe One-Step RT-qPCR Kit 可以从低至 1 pg 的总 RNA 样本中检测出 ACTB、GAPDH 和 B2M。

VII. 查错指南

问题	可能的原因	解决方法
无扩增产物或扩增产物少	RNA 模板已降解	RNA 质量是 RT-qPCR 反应成功的关键因素。在准备 RNA 样品全过程中，需要穿上工作服、戴上口罩和手套，小心仔细地按照选择的 RNA 提取流程进行操作，使用 RNA 级的试剂和耗材。提取分离的 RNA 需用变性凝胶电泳检测质量。
	RNA 模板中含有抑制剂	RNA 模板中的微量抑制剂（例如胍盐）会抑制 cDNA 合成。用无水乙醇重新沉淀 RNA 并用 75%乙醇洗涤沉淀。
	RNA 模板的量不够	如提高扩增循环数仍未有明显改善，适当提高 RNA 模板的量，但总量不要超过 100 ng。
	RNase 污染	全程保证无菌操作；使用 RNase 抑制剂。
	引物设计不佳	确认序列信息的准确性和引物序列对目标序列的特异性。
	扩增产物太长	扩增产物的最适长度范围为 80-150 bp，注意不要超过 500 bp。
	高 G-C 含量模板或者二级结构阻碍反应	反应前需要准备 RNA-Primer 混合液。在反应体系中添加反应优化剂，例如 DMSO、甜菜碱等。
扩增产物长度超过预期	RNA 样本中存在基因组 DNA	反应前使用 DNase I 消化 DNA，设计跨内含子引物或者侧翼序列引物，以避免扩增出基因组 DNA 序列。
	扩增出错误的片段	按顺序优化 RT-qPCR 反应条件。
Ct 值低于预期，且/或无模板对照组有阳性扩增	RNA 模板或各 RT-qPCR 反应间交叉污染	全程保证无菌操作。使用专用移液器进行 RT-qPCR 反应，注意更换枪头。在无 DNA 区域中进行加样操作，加样完后不要再打开 PCR 反应管/平板盖。

VIII. 使用许可与质量保证

使用限制

以下条款适用于 BlazeTaq™ Probe One-Step RT-qPCR Kit 产品。若您不能接受这些条款，请在 5 个自然日内将产品完整退还给 GeneCopoeia。产品购买者需遵守最终用户限制许可条例。本产品仅限购买者内部研究使用，不得用于人体或诊断、治疗。未经 GeneCopoeia 事先书面同意，本产品不得转售，不得重新包装或修改后转售，不得用于生产商用产品。

质量保证

GeneCopoeia 保证产品与产品数据表中描述的规格保持一致。若经 GeneCopoeia 证实产品未达到规格要求，GeneCopoeia 将为您替换产品。若无法替换，GeneCopoeia 将退款给购买者。此质量保证仅适用于最初产品购买者。GeneCopoeia 仅负责替换产品或退还实际的购买金额。对于由使用或不正确使用产品产生的损害或使用其他相关材料和试剂产生的损耗，GeneCopoeia 不承担责任。GeneCopoeia 不提供任何形式的明示的或者默示的保证，包括对适销性、适用于特定用途的默示保证。

GeneCopoeia 致力于为消费者提供高质量的研究产品。如果您对 GeneCopoeia 的产品有任何问题或疑虑，请拨打电话 4006-020-200 联系我们。

© 2019, GeneCopoeia, Inc

GeneCopoeia, Inc.
9620 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850
Tel: 301-762-0888 Fax: 301-762-3888
Email: inquiry@genecopoeia.com
Web: www.genecopoeia.com

广州易锦生物技术有限公司
广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路 3 号
广州国际企业孵化器 F 区 8 楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
网址: www.genecopoeia.com (英文) www.igenebio.com (中文)