货号：M512

5×Celerscript RT Premix (Probe qRT-PCR)

2023V01

产品概述

Celerscript RT Premix (Probe qRT-PCR) 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。本品含有去除 RNase H 活性的、高活性 Celerscript RTase 和新型热启动酶 Superstrat Taq plus，具有更高的反转录效率和 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

1. 25×Celerscript RTase Mix
2. 5×Celerscript RT Premix Buffer

保存条件

-20°C长期保存，4°C可保存 3 个月。使用前应混匀，避免反复冻融。

qRT-PCR 反应体系配制

试 剂	25 μL 体系	50 μL 体系	终浓度
5×Celerscript RT Premix Buffer	5 μL	10 μL	1×
25×Celerscript RTase Mix	1 μL	2 μL	1×
25×Primer-Probe Mix [1]	1 μL	2 μL	1×
Template RNA [2]	——	——	——
ddH_2O	To 25 μL	To 50 μL	——

1. 通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果；反应性能较差时，可以在 0.2～1 μM 范围内调整引物浓度。通常探针浓度在 0.1～0.3 μM 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。
2. 不同种类的 RNA 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 RNA 模板添加量。

反应条件

步骤	温度	时长	循环数
逆转录	50°C	10~20 min	1
变性	95°C	1~5 min	1
变性	95°C	10~20 s	40~50
退火延伸	56~64°C	20~60 s	

质量控制

1. 功能检测：qRT-PCR 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°C进行反转录反应，可以在 42°C~50°C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 min 内对反转录时间进行优化。
2. 该体系所用的 Celerscript RTase 是在 M-MLV 基础上进行了基因改造，具有更高的反转录效率和更好的体系适用性。
3. 该体系 cDNA 产量高，能够有效扩增长片段。
4. 该体系通过特殊配制，能够消除 RNA 高级结构、引物非特异性结合等因素对 cDNA 合成的不利影响，适用于高灵敏度一步法 RT-PCR 荧光定量检测。
5. 对于退火温度较低的引物或超过 200 bp 长片段扩增建议采用三步法。
6. 扩增前后请使用专用的区域和移液器，戴手套操作并经常更换；PCR 反应完成后切勿打开反应管，以最大限度地减少 PCR 产物对样品的污染。