

# **BioRT Real Time RT-PCR Kit**

## **BioRT 实时荧光 RT-PCR 试剂盒说明书**

**Cat No.: BSB23S2**

**TECHNICAL SUPPORT:**

For technical support, please dial phone number :  
0086-571-87774567-5278, 5211 or 800-857-1279  
email to [reagent@bioer.com.cn](mailto:reagent@bioer.com.cn).

**Website: [www.bioer.com.cn](http://www.bioer.com.cn)**

## 产品说明

本试剂盒是一种一步法实时 RT-PCR 扩增试剂，在同一反应体系中连续进行逆转录 (RT) 和 PCR 反应，用户使用时只需加入合适的引物探针 (染料) 和 RNA 模板就可轻松进行荧光定量 RT-PCR 反应。

本试剂盒采用一步法进行，反应过程中无需打开管盖，避免了交叉污染，同时具有高特异性，高灵敏，使用方便等特点。

## 试剂盒组成 (50 次使用量)

组成 (50T)	体积 ( $\mu\text{l}$ )	数量
RT-PCR 反应液	750 $\mu\text{l}$	1 管
增强剂	75 $\mu\text{l}$	1 管
稳定剂	75 $\mu\text{l}$	1 管

## 【储存条件及有效期】

- 1) 试剂盒必须在冷冻条件下运输。
- 2) 试剂盒必须保存 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下保存，应避免反复冻融。
- 3) 有效期：本试剂盒有效期 12 个月，请在有效期内使用。

## 适用仪器

Line-Gene 系列荧光定量 PCR 检测系统及其它厂家同类荧光定量 PCR 检测系统。

## 试剂盒质量控制

该产品加入 SYBR Green I 染料进行 GAPDH 扩增，在 Line-Gene K 荧光定量 PCR 检测系统上扩增，至少扩增四个梯度，其相关系数小于等于 $-0.980$ 。

## 实验操作 Protocol

- 1) 取出 RT-PCR 反应液、增加剂和稳定剂，进行室温解冻，上下轻缓颠倒混匀，在配制前可进行短暂离心。

## 2) 按以下条件配制反应液

RT-PCR 反应液	15 $\mu$ l
增强剂	1.5 $\mu$ l
稳定剂	1.5 $\mu$ l
上游特异性引物 (20 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
下游特异性引物 (20 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
特异性探针 (20 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
实验样品 RNA	X $\mu$ l
RNase free H <sub>2</sub> O	10.75 - X $\mu$ l
总体积	30 $\mu$ l

## 3) 实验样品标准反应条件：

90 °C	30 s	
61 °C	20 min	
95 °C	1 min	
95 °C	15 s	} 40-55 cycles
60 °C	1 min	

根据探针标记或染料选择荧光检测通道，60 °C恒温 1 min 后检测荧光；根据实验需要设置检测循环数。

在运行之前，调节增益使荧光本底值 20-40，也可根据试剂的实际情况调整。

**结果分析与判定**

- 1) 将标准品或参照物的浓度输入，选择样点拟合法进行分析，基线（零点调整）根据扩增曲线实际情况选取一段相对平稳（无异常波动）的拐点之前的荧光信号作为基线调整，噪声容限以基线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线（无规则的噪音线）的最高点，然后进行定量分析。也可根据仪器噪音情况另行调整。
- 2) 分析后记录未知样品的浓度或 CT 值。
- 3) 融解曲线分析有自动分析和手动分析，根据需要进行选择。分析后记录 T<sub>m</sub> 值。
- 4) 也可以选择利用琼脂糖凝胶电泳检查分析 PCR 产物的特异性。

## 使用提示

- 1) 适用于所有 RNA 模板，建议使用高质量 RNA；
- 2) 引物探针设计的好坏直接影响到 RT-PCR 反应的结果，设计引物考虑多种因素，如 GC 含量，引物长度，引物位置等因素，因此我们建议采用优秀的引物设计软件来设计，如 Primer Premier 5.0 等；
- 3) 一步法 RT-PCR 实验应避免 RNase 污染，可采用以下措施：
- 4) 因人的皮肤表面和唾液都有 RNase，因此实验中应戴一次性手套和口罩；
- 5) 一步法 RT-PCR 实验应使用专门的仪器和耗材，建议在专门区域操作 RNA；
- 6) 一步法 RT-PCR 实验相关耗材应使用干热灭菌（180℃，2 小时）或用 0.1 %DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在 37℃处理 12 小时后在 121℃高压灭菌 30 分钟；
- 7) RT-PCR 反应液在取用之前应离心后再吸取，吸取时动作要慢，使用后应尽快放回-20℃。
- 8) 加 RNA 模板后需要吹打混匀，上机时避免有挂滴和气泡。

## 参考文献

1. Houts, G.E., Miyagi, M., Ellis, C., Beard, D., and Beard, J.W. (1979) *J. Virol.* 29(2):517-522.
2. Guide to Molecular Cloning Techniques. Methods in Enzymology, Volume 152. pp 316-325. Edited by Shelby Berger and Alan R. Kimmel. Academic Press, Inc.
3. Aatsinki JT, Lakkakorpi JT, Pietila EM, Rajaniemi HJ. *Biotechniques.* 1994 ;16(2):282-4, 286-8.
4. F. X. LIMBACH, B. JAULHAC, Y. PIE´ MONT, J. L. KUNTZ, H. MONTEIL, AND J. SIBILIA. *J Clin Microbiol.* 1999. 2037–2039.