

## M5 One-Step qRT-PCR Kit 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 One-Step qRT-PCR Kit	100T	MF049-01
M5 One-Step qRT-PCR Kit	5×100T	MF049-05

### 【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 24 个月。

### 【产品简介】

聚合美 M5 One-Step qRT-PCR Kit 是采用探针法进行一步法实时荧光定量检测的专用试剂盒。本产品是基于高效的 M5Script II 反转录酶、抗体型 Hotstart Taq DNA 聚合酶配合优化的 Buffer 体系研制，在提高检测灵敏度的同时保证了扩增的特异性。使用本制品进行 Real Time RT-PCR 反应时以提取的 RNA 为模板，在同一反应管内连续进行反转录和荧光定量检测，操作简单，并能有效防止污染。本产品为 2x 预混增强荧光定量 PCR 反应体系，使用时只需加入模板、引物、ROX Reference Dye（用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，根据不同荧光定量 PCR 仪选择使用）和水，使其工作浓度为 1×，即可进行反应。具有快速简便、灵敏特异、稳定性好。

### 【产品组份】

M5 One Step Enzyme Mix	200µl
2x M5 Taqman One Step qRT-PCR Buffer	1ml
DEPC-ddH <sub>2</sub> O	1ml
ROX Reference Dye	40µl
ROX Reference Dye II	40µl

### 【注意事项】

1. 实验过程中请注意避免 RNase 污染。
2. 除酶以外的各种试剂，使用之前请完全溶解并充分混匀，以防因盐离子浓度不均影响实验结果。
3. RNA 模板的完整性对 cDNA 合成效率起着决定性作用，因此请选择可靠的 RNA 提取/纯化方法。建议使用 M5 Trigenet 总 RNA 提取试剂制备高质量的 RNA 模板。
4. 如果扩增片段较长或者 RNA 结构复杂，为了加强转录效果，可以将 RNA 单独置于 65-70 度加热 5-10 min 后再加入体系。
5. 制品只能使用特异性反转录引物，不能使用 Random Primer 和 Oligo dT Primer 等进行反转录反应。
6. 当同时需要进行数次 Real Time One Step qRT-PCR 反应时，应先配制各种试剂的混合液，然后再分装到每个反应管中。这样，可使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失，避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作或实验样品之间产生的误差。
7. 使用 M5 One Step Enzyme Mix 时，应轻轻混匀，避免起泡；分取之前要小心地离心收集到反应管底部；由于酶保存液中含有 50% 的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。-20°C 保存，使用后立即放回冰箱。

### 【操作示例】

#### 按下表配制 qRT-PCR 反应体系：

2× M5 Taqman One-Step qRT-PCR Buffer	10 µl
Primer 1 (10µM)	0.4 µl
Primer 2 (10µM)	0.4 µl
Probe (10µM)	0.4 µl
Template RNA	1-2µl
M5 One Step Enzyme Mix	2 µl
ddH <sub>2</sub> O 补足至	20 µl

#### 建议的 qRT-PCR 条件：

42°C	15-30 min.
两步法：	
94°C 预变性	2 min.
94°C 变性	15 sec.
60°C 退火-延伸	15-30 sec.
35-45 cycles	

#### 建议的 qRT-PCR 条件：

42°C	15-30 min.
三步法：	
94°C 预变性	2 min.
94°C 变性	15 sec.
60°C 退火	15 sec.
72°C 延伸	30 sec.
35-45 cycles	

当两步法扩增不好时建议选择三步法。

### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。