

Fast One Step Probe

RT-qPCR Kit

版本号: 16L06v1.0

目录: RK20413

规格: 100 RXN/ 500 RXN (25 μ L/RXN)

产品组成:

Fast One Step Probe Enzyme Mix	RM21484
Fast One Step RT-qPCR Probe Buffer VI	RM21485

产品说明

Fast One Step Probe RT-qPCR Kit 是采用探针法进行 RT-qPCR 反应的试剂盒, 专为快速扩增定量 RT-qPCR 检测而设计。包含反应缓冲液, 热启动 *Taq* 聚合酶, 新型逆转录酶 ABScript III Reverse Transcriptase, 热敏 UDG。本试剂盒以 RNA 为模板, 使用基因特异引物, 逆转录和 PCR 反应可在同一管内连续进行, 不需要额外的开管、移液等操作, 大大提高了检测通量。本试剂盒引入 dUTP/UDG 防污体系, 热敏感 UDG 在室温下就可将含 U 的污染物迅速降解, 50 $^{\circ}$ C 逆转录时热敏 UDG 迅速失活, 不会影响 RT-qPCR 的效率和灵敏度。

产品组分及规格

组分	规格 100 RXN	规格 500 RXN
Fast One Step RT-qPCR Probe Buffer VI*	400 μ L	1 mL*2
Fast One Step Probe Enzyme Mix**	100 μ L	500 μ L

*, 注: 含有 dNTP / dUTP Mix, 通过添加 UDG 能够防止因交叉污染而导致的假阳性发生。

** , 注: 使用了抗 DNA 聚合酶的抗体, 采用热启动体系, 含有 RNase Inhibitor, Heat-labile UDG。

注意事项

1. Fast One Step RT-qPCR Probe Buffer VI, 请先分装后再保存, 使用过程中避免反复冻融, 使用时, 请充分融解, 混匀后使用, 避免强光直射。若同时需要配制多个 One Step RT-qPCR 反应时, 应配制各种试剂的混合液, 然后再分装到每个反应管, 减少试剂损失。

2. 试剂盒中的 Fast One Step Probe Enzyme Mix 在使用前请轻轻混匀, 避免剧烈震荡产生过多气泡, 储存时, 建议分装保存; 分取之前请瞬时离心收集到管底后使用, 使用后立即放回 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。
3. 反应液的配置和分装一定使用无污染的头、Microtube, 尽量避免污染。
4. 为保证反应的成功, 建议使用高质量的 RNA 模板。
5. 本试剂盒只能使用特异性引物, 不能使用随机引物或 Oligo dT 引物等进行反转录反应。
6. 一步法 RT-qPCR 实验设计用于扩增的引物时, 推荐扩增产物长度在 70-200 bp, 效果最佳。

操作说明

实验准备

1. 1.5 mL RNase-free EP 管、RNase-free PCR 管、移液器和枪头、冰盒或冰。
2. PCR 探针、引物与模板。
3. 荧光定量 PCR 专用管或平板。

实验方法

用户需自备的试剂: RNA 模板、引物、探针。

请按照不同品牌荧光定量 PCR 仪的使用说明书要求进行实验操作。

1. 体系推荐

推荐冰上配制反应体系, 以 25 μ L 体系为例:

组份	加入体积
Fast One Step RT-qPCR Probe Buffer VI	4 μ L
Fast One Step Probe Enzyme Mix	1 μ L
上/下游引物, 探针	Y μ L*
模板	X μ L
Nuclease-free H ₂ O	to 25 μ L

*, 注: 引物/探针加入的量需要滴定, 快速程序需要的浓度, 与正常反应可能不一致。其中 FAM 通道最佳的引物探针浓度范围为: 0.16-0.32 μ M, VIC/ROX/TAMARA 通道的引物与探针浓度在 0.32-0.48 μ M。

1) 30 μ L、50 μ L 反应体系在 ABI StepOne Plus、ABI 7500、Bio-rad CFX-96 等机型上按照相应的比例放大即可。

2) 国产仪器 AGS8830 上推荐的 30 μ L 反应体系需要将 Fast One Step Probe Enzyme Mix 的量调节至 2 μ L。

2. 推荐的 One Step RT-qPCR 反应程序:

步骤	温度	时间	循环数 (Cycles)
反转录	50°C	2 min	1
预变性	95°C	2 s	1
循环反应	95°C	1 s	41
	60°C	5-20 s*	

**，注：延伸时间请根据您使用的 Real Time PCR 仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用 ABI 7300 和 7500 时请设定为 31 s。*

其他仪器的延伸时间，需要根据仪器的情况测试。

注：本产品还兼容反转录 50°C 5 min，预变性 95°C 3 min，变性 95°C 15 s，延伸 60°C 30 s 的常规扩增程序。

3. 反应结束后确认 Real Time PCR 扩增曲线，进行标准曲线制作等。