

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2
		100 RXN (25 μ L/RXN)	500 RXN (25 μ L/RXN)
Lyophilization RT Enzyme Mix	RM21489	10 μ L	50 μ L
2X Lyophilization One Step RT-qPCR Probe Mix	RM21490	1.25 mL	1.25 mL*5

产品说明

Lyophilization One-Step RT-qPCR probe Kit 是采用探针法进行 RT-qPCR 反应的通用款可冻干试剂盒。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, 及 RNase 抑制剂 (RI)。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°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。本产品甘油含量低于 0.2%, 并且含有冻干保护剂及赋形剂, 适用于冻干粉及冻干微球的冻干, 冻干成微球后, 可在 45°C 放置 6 个月, 而产品性能不下降。

保存温度

-20°C

注意事项

1. 使用 2X Lyophilization One Step RT-qPCR Probe Mix 时, 请充分融解, 混匀后使用, 避免强光直射。使用过程中避免反复冻融, 冻融次数控制在 5 次以内, 建议分装保存。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 Lyophilization RT Enzyme Mix 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°C 冰箱保存。
3. 反应液的配置和分装一定使用无污染的枪头、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

实验前准备

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. 配制冻干体系

1.1 推荐冰上配制冻干体系, 以 25 μ L 体系为例:

试剂	25 μ L
2X Lyophilization One Step RT-qPCR Probe Mix	12.5 μ L
Lyophilization RT Enzyme Mix	0.1 μ L
Nuclease-free H ₂ O	to 25 μ L

注: 若不含模板、引物和探针进行冻干, 直接加无核酸酶水补充至 25 μ L 总体积; 含引物探针进行冻干的情况下, 模板、引物、探针和无核酸酶水一起补充至 25 μ L 总体积。

1.2 分装到反应管中立即转移到冷冻干燥机并进行适合的干燥循环。为了样本能在室温下长期保存, 冻干后产品应在相对湿度较低环境下进

行包装。

1.3 冻干参数设置推荐

阶段		温度 (°C)	斜率时间 (min)	保持时间 (hr)	真空控制 (mbar)
预冻	1	-45	60	2	/
	2	-42	30	/	/
	3	/	/	1	0.16
主干燥	4	-42	/	8	0.16
	5	-30	1	/	0.16
	6	25	160	1.5	0.1
解析干燥	7	35	20	3	0.1
	8	25	20	2	0.1

2. 试剂配制

2.1 若冻干体系含模板、引物和探针：直接加 25 μ L 无核酸酶水进行复溶即可；

2.2 若冻干体系不含模板、引物和探针：将 25 μ L 模板、引物探针和无核酸酶水混合液加入到装有冻干后 RT-qPCR 混合物（1.1 的体系）反应管中进行复溶。

2.3 模板与引物探针混合液体系推荐，以 25 μ L 体系为例：

组份	加入体积
正向引物 (10 μ M) *	0.5 μ L
反向引物 (10 μ M) *	0.5 μ L
TaqMan Probe (10 μ M) **	0.5 μ L
Total RNA***	2.5 μ L
Nuclease-free H ₂ O	to 25 μ L

*, 注：通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果，反应性能较差时，可以在 0.1-1.0 μ M 范围内调整引物浓度。扩增产物的长度建议选择在 70-200 bp 范围内。

**, 注：探针浓度可在 50-250 nM 内进行调整。

***, 注：建议在 25 μ L 体系中加入 25 pg-100 ng Total RNA 为模板。

步骤	温度	时间	循环数 (Cycles)
UDG 反应	25°C	5 min	1
反转录	50°C	5 min	1
预变性	95°C	3 min	1
循环反应	95°C	5-15 s	40~45
	60°C	30-34 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 StepOne Plus 时请设定为 30 s；使用 7300 时请设定为 31 s；使用 7500 时请设定 34 s。

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