

一步法 RT-qPCR Kit (防污染体系)

使用说明书 (VTM0003)

Ve2023©version1.0



产品组份

组份名称	组分编号	规格 X 数量	
		50 T(20 μ L 体系 T)	250 T(20 μ L 体系 T)
2X 一步法 RT-qPCR Buffer IV*	VT21475	500 μ L	1.25 mL x 2
一步法 Enzyme Mix IV**	VT21476	100 μ L	500 μ L
Nuclease-free H ₂ O	VT20214	500 μ L	1.25 mL x 2

*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。*** 用于校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

** 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

产品说明

一步法 RT-qPCR Kit (防污染体系) 是采用探针法进行 RT-qPCR 反应的通用款试剂盒。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。本反应体系可以对扩增产物进行实时检测, 大大提高了检测灵敏度, 并且省略了 PCR 反应后的电泳步骤, 非常适用于 RNA 病毒等微量 RNA 的检测。本制品使用适合 RT-qPCR 的新型逆转录酶 ABScript III Reverse Transcriptase 高效合成第一链 cDNA, 搭配使用探针和 Taq DNA Polymerase, 配合经过优化的缓冲体系, 具有高扩增效率和高扩增灵敏性, 能稳定高效的进行一步法 RT-qPCR 反应。

保存温度

-20°C。

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 引物、探针和模板;
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 One Step RT-qPCR 反应体系:
推荐冰上配制反应体系, 以 20 μ L 反应体系为例:

组份	加入体积	加入体积
2X 一步法 RT-qPCR Buffer IV	10 μ L	25 μ L
一步法 Enzyme Mix IV**	2 μ L	5 μ L
上游引物(10 μ M) *	0.4 μ L	1 μ L
下游引物(10 μ M) *	0.4 μ L	1 μ L
探针(10 μ M) ***	0.4 μ L	1 μ L
Total RNA **	4 μ L	5 μ L
Nuclease-free H ₂ O	To 20 μ L	To 50 μ L

* 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。

** 建议在 20 μ L 的体系中加入 10 pg~100 ng 的 Total RNA 为模板。

*** 探针浓度可在 50-250nm 内进行调整。

2. 推荐的 One Step RT-qPCR 反应程序:

步骤	温度	时间	循环数
(UDG) 反应	25°C	5min	1
反转录	50°C	5min	1
预变性	95°C	3min	1
循环反应	95°C	5-15s	45
	60°C	30-34s	

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 StepOnePlus 时请设定为 30 s; 使用 7300 时请设定为 31 s; 使用 7500 时请设定为 34 s.

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

4. 试验示例。

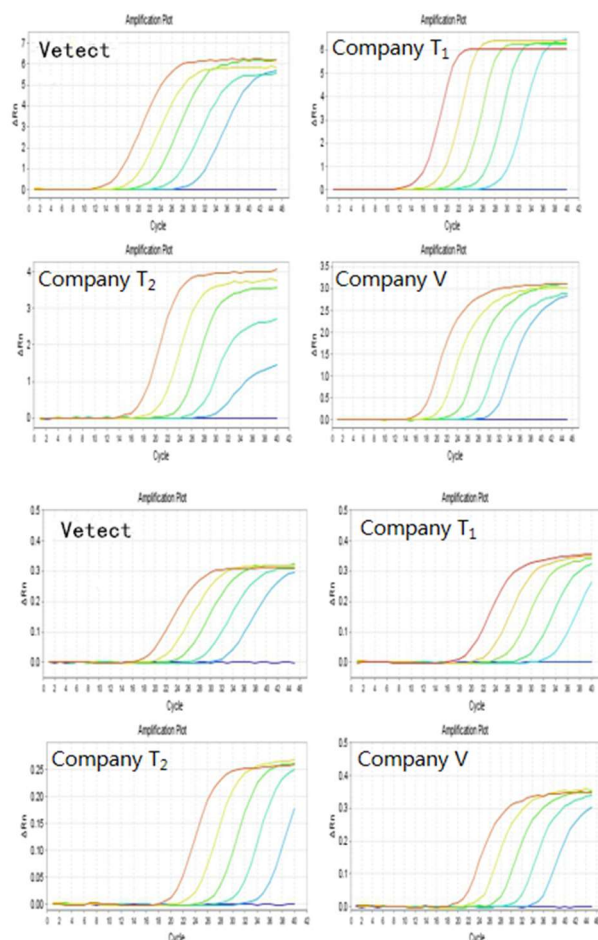


图 1: 以小鼠 RNA 为模板(100 ng/μl 为起始浓度), 5'端 TAMRA 荧光标记探针, 10 倍梯度稀释, 能很好的检测出目的基因, 同其他厂家产品相比具有较高的检测灵敏性。

图 2: 以人 RNA 为模板(100 ng/μl 为起始浓度), 5'端 FAM 荧光标记探针, 10 倍梯度稀释, 能很好的检测出目的基因, 同其他厂家产品相比具有较高的检测灵敏性。