

ABScript III One Step RT-qPCR

Probe Kit with UDG V5

版本号: 17D06V1.1

目录: RK20412

规格: 50 RXN / 250 RXN (20 μL/RXN)

产品组成:

2X One Step RT-qPCR Probe Buffer IV	RM21475
One Step Probe Enzyme Mix IV	RM21476
50X ROX Dye I	RM21465
50X ROX Dye II	RM21466
Nuclease-free H ₂ O	RM20214

产品说明

ABScript III One Step RT-qPCR Probe Kit with UDG V5 是采用探针法进行 RT-qPCR 反应的通用试剂盒。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 逆转录时热敏感 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。

产品规格及组分:

组分	50 RXN (20 μL 体系/ RXN)	250 RXN (20 μL 体系/ RXN)
2X One Step RT-qPCR Probe Buffer IV*	500 μL	1.25 mL X 2
One Step Probe Enzyme Mix IV**	100 μL	500 μL

50X ROX Dye I ***	20 μL	100 μL
50X ROX Dye II ***	20 μL	100 μL
Nuclease-free ddH ₂ O	500 μL	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。

** 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

*** 用于校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

保存条件

-20°C 保存

适用机型:

类型	仪器
无需添加 ROX 参比染料	Bio-Rad iCycler 系列, Roche Light Cycler 系列, Qiagen/Corbett 系列等
50X ROX Dye I (High Rox)	ABI 7000/7300/7700/7900, ABI StepOne/StepOnePlus 等
50X ROX Dye II (Low Rox)	ABI 7500, ABI ViiA™7, ABI QuantaStudio 系列, Stratagene 系列, Corbett Rotor Gene 3000 等

注意事项

1. 使用 2X One Step RT-qPCR Probe Buffer IV 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 One Step Probe Enzyme Mix IV 含有高浓度甘油, 在使用前请轻轻混匀, 避免起泡; 分取之前请瞬时离心收集到管底后使用, 使用后请立即放回 -20°C 冰箱保存。
3. 反应液的配制和分装一定使用无污染的气枪头、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

实验准备：

- 1.5 mL RNase-free EP 管、RNase-free PCR 管、移液器和枪头、冰盒或冰。
- PCR 探针、引物与模板。
- 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：

组分	加入体积	加入体积
2X One Step RT-qPCR Probe Buffer IV	10 μ L	25 μ L
One Step Probe Enzyme Mix IV	2 μ L	5 μ L
正向引物(10 μ M) *	0.4 μ L	1 μ L
反向引物(10 μ M) *	0.4 μ L	1 μ L
TaqMan Probe (10 μ M) ***	0.4 μ L	1 μ L
50X ROX Dye	0.4 μ L	1 μ L
Total RNA **	2 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 50-250 nM 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 (Cycles)
(UDG) 反应	25 $^{\circ}$ C	5 min	1
反转录	50 $^{\circ}$ C	5 min	1
预变性	95 $^{\circ}$ C	3 min	1
循环反应	95 $^{\circ}$ C	5-15 s	45
	60 $^{\circ}$ C	30-34 s	

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

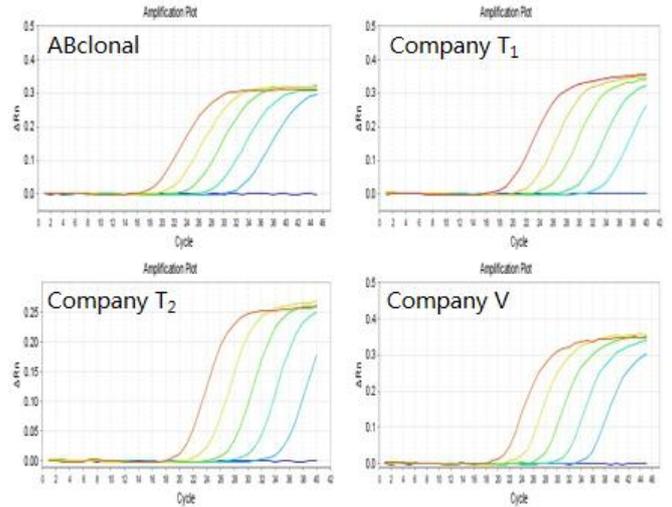


图 1：以小鼠 RNA 为模板(100 ng/ μ l 为起始浓度)，5'端 TAMRA 荧光标记探针，10 倍梯度稀释，能很好的检测出目的基因，同其他厂家产品相比具有较高的检测灵敏性。

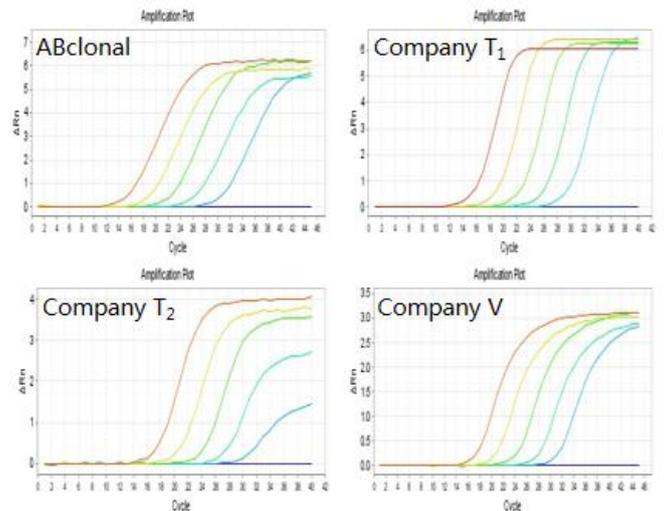


图 2：以人 RNA 为模板(100 ng/ μ l 为起始浓度)，5'端 FAM 荧光标记探针，10 倍梯度稀释，能很好的检测出目的基因，同其他厂家产品相比具有较高的检测灵敏性。