

# One-step Probe RT-qPCR Kit

货号: V5001, V5002

## 产品简介

One-step Probe RT-qPCR Kit 是一步法逆转录-荧光定量检测试剂盒，直接以 RNA（如病毒 RNA）为模板，在同一反应管内进行逆转录和探针法 qPCR，减少了操作的步骤，不但提高了检测的效率，而且降低了污染的风险。同时引入了 dUTP/UDG 防污染系统。室温下热敏 UDG 酶将含尿嘧啶 U 的 DNA 迅速降解；55℃ 逆转录时，热敏 UDG 酶迅速失活，不会影响 RT-qPCR 的效率和灵敏度。耐热逆转录酶可以在 55℃ 保持稳定的活性。抗体法修饰的热启动 DNA 聚合酶配合优化的缓冲体系，保证 One-step Probe RT-qPCR Kit 极高的灵敏度和特异性。试剂盒以便捷的 Master Mix 形式提供。2 × One Step U+ Mix 包含优化的缓冲体系和 dNTP/dUTP mix，适用于 TaqMan 等荧光标记探针的高特异性检测系统。

## 产品组成

Component	V5001(200 rxn, 30 μl/rxn)	V5002 (5000 rxn, 30 μl/rxn)
2 × One-step U <sup>+</sup> Mix <sup>a</sup>	760 μl × 4	38.4 ml × 2
One-step U <sup>+</sup> Enzyme Mix <sup>b</sup>	308 μl	7.7 ml
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	800 μl × 4	76 ml
50 × ROX Reference Dye 1 <sup>c</sup>	120 μl	1 ml × 3
50 × ROX Reference Dye 2 <sup>c</sup>	120 μl	1 ml × 3

a 包含 dNTP/dUTP Mix 及反应缓冲液等。

b 包含逆转录酶，RNase 抑制剂，Hotstart Taq DNA 聚合酶，热敏 UDG 酶等。

c 用于校准孔间加样误差。50 × ROX Reference Dye 1 适用机型包括 ABI 7900HT/7300 real-time PCR System, StepOne Plus; 50 × ROX Reference Dye 2 适用机型包括 ABI 7500, 7500 Fast, Stratagene Mx3000P; Roche, bio-rad 等品牌机型无需 ROX。

## 保存条件

-20℃ 保存。

## 质量控制

纯度检测：经质量检测，产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测：经不同来源的模板和引物检测，产品具有优秀的特异性、灵敏性及可重复性等。

## 应用举例

### 1. 配制反应体系

以 ABI StepOnePlus 为例，请于冰上配制以下反应体系：

Component	Volume	Final concentration
2 × One-step U <sup>+</sup> Mix	15 μl	1 ×
One-step U <sup>+</sup> Enzyme Mix	1.5 μl	–
50 × ROX Reference Dye 1	0.6 μl	1 ×
Forward Primer (10 μM)	0.6 μl	0.2 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.6 μl	0.2 μM
Probe (10 μM)	0.3 μl	0.1 μM
Template RNA	1 pg-1 μg	1 pg-1 μg/30 μl
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	to 30 μl	–

以上组分的用量可以参照以下原则进行调整：

- DNA 模板建议用量（30 μl 体系）：2-5 μl。加样体积不宜过小，以免造成较大的误差。
- 引物终浓度建议范围：0.1-1.0 μM，通常引物终浓度为 0.2 μM 效果较好。
- 探针终浓度建议范围：50-250 nM。
- 产物大小建议范围：80-200 bp。

### 2. 设定反应程序进行 qPCR 反应

标准 RT-qPCR 模式（最大化反应灵敏性）：

Reverse transcription	50-55°C <sup>a</sup>	15 min	/
Initial denaturation	95°C	30 sec	/
Circular reaction	95°C	10 sec	45 Cycles
	60°C	30 sec <sup>b</sup>	

快速 RT-qPCR 模式（适用于大多数反应）：

Reverse transcription	50-55°C <sup>a</sup>	5 min	/
Initial denaturation	95°C	30 sec	/

Circular reaction	95°C	5 sec	45 Cycles
	60°C	20 sec °	

- 对于具有复杂二级结构或高 GC 区域的模板，可以通过提高逆转录温度至 55 摄氏度来提高扩增的效率和灵敏度。
- 延伸时间应根据所用机型的信号收集时间限制来设置，如 ABI 7700 和 7900HT 至少需要 30 秒，ABI 7000 和 7300 至少需要 31 秒，ABI 7500 至少需要 34 秒。
- 请进行预实验测试所用机型是否可以快速扩增模式。

### 3. 分析结果

按照仪器使用说明进行数据分析。

本品仅供科学研究使用。