

Evo M-MLV一步法RT-qPCR 探针法试剂盒 (含UNG)

Evo M-MLV One Step RT-qPCR Probe Kit (UNG Plus)

Code No. AG11754

包装量:	200 rxns / 25 μ l
保存温度:	-20 $^{\circ}$ C

产品概述

本产品是基于探针法进行一步法 RT-qPCR 专用试剂盒，反转录和 qPCR 反应在同一管内完成，操作简单、快捷。

本产品使用了延伸能力较强的 *Evo M-MLV* 反转录酶，整合热启动 *Accurate Taq HS* 的优越性能，可以在短时间内高效合成 cDNA 并进行高效稳定的 qPCR 扩增。本产品适用性广，对于不同复杂度的基因均可以进行很好的扩增，同时该产品可兼顾单重或多重检测。适用于病毒 RNA 等微量 RNA 的检测。

本产品中还引入了 dUTP/UNG 防污染系统，在 PCR 反应过程中以 dUTP 取代 dTTP，利用 UNG 酶能选择性水解含 dU 的 DNA 链，而对不含 dU 的 DNA 链没有任何影响的特性，除去 PCR 反应体系配制过程中引入的含 dU 的污染模板，从而可有效防止 PCR 假阳性结果的产生；同时，本产品中还添加了在常温状态下能够抑制 DNA Polymerase 活性的单克隆抗体，能够有效抑制非特异性扩增，提高反应灵敏度，提升结果准确性。

保存及运输

保存温度：-20 $^{\circ}$ C 保存

运输温度：干冰运输或 -20 $^{\circ}$ C 冰袋运输

产品组成

2X One Step RT-qPCR Buffer IV(Probe)	1.25 ml X 2 pcs
One Step Enzyme Mix IV*	400 μ l
RNase free water	1 ml X 3 pcs

*: 含有 *Evo M-MLV* RTase Enzyme、*Accurate Taq HS* DNA Polymerase、UNG Enzyme 与 RNase Inhibitor 等。

实验操作

(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems 为例)

反应体系¹

组分名称	终浓度	加入量
2X One Step RT-qPCR Buffer IV	1X	12.5 μ l
One Step Enzyme Mix IV	-	2 μ l
Primer F (10 μ M)	0.2 μ M ²	0.5 μ l
Primer R (10 μ M)	0.2 μ M ²	0.5 μ l
Probe (10 μ M)	0.4 μ M ³	1 μ l
ROX Reference Dye (4 μ M) ⁴	0.08 μ M	0.5 μ l
Template	-	\leq 100 ng ^{5,6}
RNase free water	-	up to 25 μ l



- *1: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。
- *2: 引物通常使用终浓度为 0.2 μM, 也可根据实际需求在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整。
- *3: 探针浓度与使用的定量 PCR 仪、荧光标记物质种类有关, 请参照仪器说明书及荧光探针的具体使用要求调整。探针推荐使用终浓度为 0.4 μM, 可根据实际需求在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内进行调整。
- *4: 如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准, 请按照仪器推荐量添加。若不需要使用 ROX 进行荧光信号校准, ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。
- *5: 在 25 μl 体系里, RNA 模板添加量通常不高于 100 ng。必要时可以进行梯度稀释, 以确定合适的模板添加量。
- *6: 该制品灵敏度极高, 25 μl 反应体系中, 建议将模板稀释后加入 2-5 μl/样本, 以提升实验的准确度及重复性。

RT-qPCR 反应条件*1 (两步法PCR反应程序)

步骤	温度	时间	循环数
UNG 处理	25°C ^{*2}	10 min ^{*2}	1
反转录	50°C ^{*3}	15 min ^{*3}	1
预变性	95°C	30 sec ^{*4}	1
变性	95°C	5 sec	} 45
退火和延伸 ^{*6}	60°C ^{*5}	30 sec ^{*5}	

*1: 请参照仪器操作手册设置反应条件。

*2: 建议在 25°C, 10 min 条件下进行 UNG 处理, 能够充分降解含 dU 的污染模板; 可根据实际需求在 5 ~ 10 min 范围内调整处理时间。

- *3: 反转录反应在 50°C, 15 min 条件下可以得到较好的结果; 同时, 也可根据实际需求在 5 ~ 15 min 范围内调整反转录反应时间, 以得到理想的实验结果。
- *4: 预变性时间通常设定为 30 sec, 如果模板变性困难, 可根据实际需求在 30 sec ~ 5 min 调整预变性时间。
- *5: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增退火和延伸反应条件设定为 60°C、30 sec 时可以满足要求; 如需提高反应特异性, 可适当提高退火和延伸温度; 如需提高扩增效率, 或者 PCR 扩增产物较长, 则可将反应退火和延伸时间适当延长, 同时也可以尝试进行三步法 PCR 扩增 (三步法 PCR 反应程序可参考附录)。
- *6: 此步骤进行荧光信号采集。

➤ **结果检测**

反应结束后, 确认扩增曲线, 并进行标准曲线分析。
(分析方法请参照仪器操作手册)

➤ **附录: 三步法 PCR 反应程序**

步骤	温度	时间	循环数
UNG处理	25°C	10 min	1
反转录	50°C	15 min	1
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	5 sec	} 45
退火	55°C	30 sec	
延伸 ^{*1}	72°C	30 sec	

*1: 此步骤进行荧光信号采集。

详细信息请查阅 www.agbio.com.cn

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.