

## SuperFast Probe One Step RT-qPCR U+ Kit

目录号: S666097 (200 rxns)

保存条件: -30°C ~ -15°C 保存, ≤0°C 运输。

### 产品内容

Component	200 rxns
5×SuperFast One Step RT-qPCR U+ Buffer	1 mL
SuperFast One Step U+ Enzyme	200 µL
RNase-Free Water	2×1.5 mL

### 产品简介

SuperFast Probe One Step RT-qPCR U+ Kit 专为以 RNA 为模板(如 RNA 病毒)的定量 PCR 检测 而设计。使用基因特异性引物(GSP), 逆转录和 qPCR 反应在一管内完成, 不需要额外的开管/移液操作, 大大提高了检测通量, 并降低了污染的风险。本试剂盒中引入了 dUTP/UNG 防污染系统。热敏感 UNG 在室温下即可将含 U 的污染物迅速降解; 55°C 逆转录时迅速失活, 不会影响 qRT-PCR 的效率和灵敏度。配合经过优化的缓冲体系和抗体修饰 Taq 酶以及突变后的 M-MLV, SuperFast Probe One Step RT-qPCR U+ Kit 的检测灵敏度可达到 0.1pg 总 RNA 或 <10 拷贝的 RNA 模板且具有更高的热稳定性。5×SuperFast One Step RT-qPCR U+ Buffer 包含优化的缓冲体系和 dNTP/dUTP Mix, 尤其适用于 TaqMan 等荧光标记探针的高特异性、低模板浓度和多重快速检测。

### 注意事项

使用前请在本品完全融化后上下颠倒轻轻混匀, 尽量避免起泡, 并经短暂离心后使用。避免反复冻融本品。ROX 染料用于校正定量 PCR 孔间产生的荧光信号误差, 本品中不含 ROX 染料, 如所使用仪器需匹配 ROX 染料, 请联系当地业务或致电康为世纪客服, 电话 4006-222-360。

### PCR 反应体系

上海阿拉丁生化科技股份有限公司

电话: 400-620-6333

试剂	50 $\mu\text{L}$ 体系	25 $\mu\text{L}$ 体系	终浓度
5×SuperFast One Step RT-qPCR U+ Buffer	10 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	
SuperFast One Step U+ Enzyme	2 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1×
Forward Primer, 10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$	0.2 $\mu\text{M}$ (1)
Reverse Primer, 10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$	0.2 $\mu\text{M}$
Probe2	0.5 $\mu\text{L}$	0.25 $\mu\text{L}$	0.1 $\mu\text{M}$
Template RNA3)	X $\mu\text{L}$	X $\mu\text{L}$	
RNase-Free Water	Up to 50 $\mu\text{L}$	Up to 25 $\mu\text{L}$	

注意:

1) 通常引物终浓度以 0.2  $\mu\text{M}$  可以得到较好结果, 可以在 0.1-1.0  $\mu\text{M}$  作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下, 可提高引物的浓度; 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度, 由此优化反应体系。

2) 所用探针的终浓度, 与使用的荧光定量 PCR 仪、探针种类、荧光标记物质种类有关, 实际使用时请参照仪器说明书, 或各荧光探针的具体使用要求进行浓度的调节。

3) 因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同, 可对模板进行梯度稀释, 以确定最佳的模板使用量

#### PCR 反应条件

步骤	温度	时间	循环
逆转录	55°C	1 min	1
预变性	95°C	10s(1)	1
变性	95°C	1 s	40-45
退火/延伸	55-60°C(2)	10-15s(3)	40-45

注意:

1) 本产品所采用的酶在预变性 95°C, 30s 条件下实现酶的活化。在此条件下, 大多数模板可良好的进行解链。对 GC 含量高、二级结构复杂的模板, 可将预变性时间延长至 1 min, 以使起始模板充分解链, 若高温处理时间过长, 会对酶的活性造成影响; 对于简单模板也可采用预变性 1-10s, 可根据模板情况确定最佳的预变性时间。

2) 建议采用两步法 PCR 反应程序, 退火温度请以 55-60°C 作为设定范围的参考, 发生非特异性反应时, 可提高退火温度。若因使用 T<sub>m</sub> 值较低的引物或者扩增产物过长等原因, 得不到良好的实验结果时, 可尝试进行三步法 PCR 扩增。

3) 实际使用的 Real Time PCR 仪是否支持快速扩增循环, 初次尝试请进行预实验验证。