

## One-step Probe RT-qPCR Kit V3

货号: V5011, V5011-2

### 产品简介

One-step Probe RT-qPCR Kit V3 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; 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°C 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 V3 极高的灵敏度和特异性。试剂盒以便捷的 Master Mix 形式提供。5X 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	V5011 (200 rxn, 20 µl/rxn)	V5011-2 (1,000 rxn, 20 µl/rxn)
5X One-step U <sup>+</sup> Mix <sup>a</sup>	800 µl	1 ml × 4
One-step U <sup>+</sup> Enzyme Mix V3 <sup>b</sup>	200 µl	1 ml
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	1 ml	15 ml

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。

### 保存条件

-20°C 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

请于冰上配制以下反应体系:

Component	Volume	Final concentration
5X One-step U <sup>+</sup> Mix	4 µl	1 ×
One-step U <sup>+</sup> Enzyme Mix V3	1 µl	–
Forward Primer (10 µM)	0.4 µl	0.2 µM
Reverse Primer (10 µM)	0.4 µl	0.2 µM
Probe (10 µM)	0.2 µl	0.1 µM
Template RNA	1 pg-1 µg	1 pg-1 µg/20 µl
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	To 20 µl	–

以上组分的用量可以参照以下原则进行调整:

- 模板建议用量 (20 µl 体系): 1-4 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>	2-5 min	/
Initial denaturation	95°C	2-15 sec	/
Circular reaction	95°C	1-10 sec	45 Cycles
	60°C	10-20 sec <sup>c</sup>	

a. 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。

b. 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。

c. 请进行预实验测试所用机型是否可以进行快速扩增模式。

### 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。