

Evo M-MLV一步法RT-qPCR试剂盒II (探针法)

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

Code No. AG11713

包装量:	250 rxns / 20 μ l
保存温度:	-20 $^{\circ}$ C

➤ 产品概述

本产品是使用探针法进行 One Step RT-qPCR 专用的试剂盒，反转录和 qPCR 反应在同一管内完成，不需要额外的开管或移液加样的操作，操作简便、快捷，可有效降低污染风险。同时本产品使用了延伸能力强的 *Evo M-MLV* 反转录酶，整合热启动酶 *Pro 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。本产品可以对扩增产物进行实时监测，大大提高监测灵敏度，非常适合病毒 RNA 等微量 RNA 的检测。

➤ 保存及运输

保存温度：-20 $^{\circ}$ C 保存

运输温度：干冰运输或者 -20 $^{\circ}$ C 冰袋运输

➤ 产品组成*1

2X One Step RT-qPCR Buffer II (Probe)*2	1.25 ml x 2 pcs
<i>Pro Taq</i> HS DNA Polymerase (5U/ μ l)	100 μ l
<i>Evo M-MLV</i> RTase Enzyme Mix II*3	100 μ l
RNase free water	1 ml x 3 pcs

*1: 本产品中不含探针。

*2: 2X One Step RT-qPCR Buffer II (Probe) 中含有 dNTP Mixture 与反应 Buffer。

*3: *Evo M-MLV* RTase Enzyme Mix II 中含有 *Evo M-MLV* RTase 与 RNase Inhibitor。

➤ 注意事项

1. 防止 RNase 污染，请保持实验区域洁净，实验所用的离心管、枪头等耗材均需 RNase-free 级别。
2. *Evo M-MLV* RTase Enzyme Mix II 和 *Pro Taq* HS DNA Polymerase 甘油浓度较高，使用前请短暂离心，并用移液器轻柔吹打混匀，再进行使用。
3. 2X One Step RT-qPCR Buffer II (Probe) 溶解后管底可能有不溶物，如有请充分混匀至沉淀全部消失。
4. 使用本产品进行反转录反应时必须使用特异性引物，Random Primer、Oligo dT Primer 不能使用。

实验操作

(以ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems为例)*1、*2

组分名称	反应终浓度	加入量
2X One Step RT-qPCR Buffer II (Probe)	1X	10 μl
<i>Pro Taq</i> HS DNA Polymerase (5 U/μl)	2 U	0.4 μl
<i>Evo M-MLV</i> RTase Enzyme Mix II	-	0.4 μl
Primer F (10 μM)	0.2 μM ^{*3}	0.4 μl
Primer R (10 μM)	0.2 μM ^{*3}	0.4 μl
Probe	0.1 ~ 0.8 μM ^{*4}	-
ROX Reference Dye (4 μM) ^{*5}	0.08 μM	0.4 μl
Template ^{*6}	≤100 ng	-
RNase free water	-	up to 20 μl

*1: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。

*2: 反应液配制需在冰上进行。如需同时进行数次反应，应先配制各试剂的混合液，然后分装到每个反应管中。

*3: 引物通常使用终浓度为 0.2 μM，也可以在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整。

*4: 使用的探针浓度，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。通常探针终浓度可在 0.1 ~ 0.8 μM 范围内进行调整。

*5: 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 的 PCR 仪，ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。

*6: 在 20 μl 体系里，RNA 模板添加量通常不高于 100 ng。必要时可以进行稀释，以确定合适的模板添加量。

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.

RT-qPCR 反应条件*1 (两步法 PCR 反应程序)

步骤	温度	时间	循环数
反转录	42°C ^{*2}	5 min ^{*2}	1
预变性	95°C	30 sec ^{*3}	1
变性	95°C	5 sec	} 40 ~ 45
退火和延伸	60°C ^{*4}	30 sec ^{*4}	

*1: 请参照仪器操作手册设置反应条件。

*2: 通常反转录反应在 42°C, 5 min 条件下可以得到较好的结果，也可根据具体实验情况，尝试调整反转录反应温度和时间，以得到理想的实验结果。

*3: 预变性时间通常设定为 30 sec，如果模板变性困难，可以延长预变性时间至 1 ~ 2 min。

*4: 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，同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。

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)