

Evo M-MLV一步法RT-qPCR试剂盒 III (探针法)

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

Code No. AG11715

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

产品概述

本制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，操作简单、快捷，可有效降低污染风险。本制品的反转录酶与buffer经过优化，适用性广泛，尤其适合GC含量较高或具有复杂二级结构的RNA的扩增。本制品使用了延伸能力较强的Evo M-MLV II反转录酶，整合热启动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，非常适合病毒RNA等微量RNA的检测。

保存

保存温度：-20 $^{\circ}$ C

运输温度：干冰或者-20 $^{\circ}$ C冰袋

产品组成

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

*1: 含有dNTP Mixture与反应buffer。

*2: 含有Evo M-MLV II RTase, 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 III和Pro Taq HS DNA Polymerase 甘油浓度较高，使用前请短暂离心，并用移液枪轻轻吹打混匀，再进行使用。
3. 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。
4. 2X One Step RT-qPCR Buffer III (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。
5. 使用本制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)

| 组分名称 | 反应终浓度 | 加入量 |
|--|--------------------------------|-------------------------------|
| 2X One Step RT-qPCR Buffer III (Probe) | 1 x | 10 μ l |
| Pro Taq HS DNA Polymerase (5 U/ μ l) | 2 U | 0.4 μ l |
| Evo M-MLV RTase Enzyme Mix III | - | 0.4 μ l |
| Primer F (10 μ M) | 0.2 μ M ¹ | 0.4 μ l |
| Primer R (10 μ M) | 0.2 μ M ¹ | 0.4 μ l |
| Probe | 0.1 - 0.8 μ M ² | - |
| ROX Reference Dye (4 μ M) | 0.08 μ M ³ | 0.4 μ l |
| Template | < 100 ng ⁴ | - |
| RNase free water | - | up to 20 μ l ⁵ |

*1: 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。

*2: 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。

*3: 如果需要使用ROX进行荧光信号校准, 可选择如下产品配合使用:

ROX Reference Dye (20 μM) (AG11703)

ROX Reference Dye (4 μM) (AG11710)

注: 上述ROX Reference Dye产品在反应体系中建议50X稀释使用, 如果实验结果不理想, 可调整ROX Reference Dye添加量。

*4: 在20 μl体系里, RNA模板添加量通常在 100 ng以下, 必要时可以进行梯度稀释, 以确定合适的模板添加量。

*5: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。

RT-qPCR反应条件[®] (两步法PCR反应程序)

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|--------|--------------------|---------------------|---------|
| Step 1 | 42°C ^{*7} | 5 min ^{*7} | 1 |
| Step 2 | 95°C | 30 sec | 1 |
| Step 3 | 95°C 60°C | 5 sec 30 sec | } 40-45 |

*6: 请参照仪器操作手册设置反应条件。

*7: 通常42°C、反应时间5 min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。

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)

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.

附录: 适合的定量PCR仪

● 无需添加ROX Reference Dye的定量PCR仪:

(Bio-Rad) IQ5, CFX96™, CFX384™, CFX Connect™, MJOpticon, Opticon 2;
 (Cepheid) SmartCycler® System, Smart Cycler II System;
 (Roche) LightCycler®2.0, 480, 96;
 (Qiagen) Rotor-Gene® Q, 3000, 6000;
 (Bioer) Line-Gene;
 (Eppendorf) Mastercycler ep realplex;
 (Analytik Jena) qTOWER3;
 (TaKaRa) Thermal Cycler Dice™ TP700, TP760, TP900, TP960, TP950, TP970, TP980, TP990;

● 需要添加ROX Reference Dye (20 μM) 的定量PCR仪:

(ROX Reference Dye终浓度为0.4 μM)
 (Thermo) ABI 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus;

● 需要添加ROX Reference Dye (4 μM) 的定量PCR仪:

(ROX Reference Dye终浓度为0.08 μM)
 (Thermo) ABI 7500, 7500 Fast, ViiA™7, QuantStudio™ 3 / 5, QuantStudio™ 6 / 7 / 12K Flex, QuantStudio™ Dx;
 (Agilent) Mx3000P™, Mx3005P™, MX4000™.