

## Evo M-MLV一步法RT-qPCR试剂盒 (适用于经典猪瘟病毒检测, 含UNG, 不含引物探针)

Evo M-MLV One Step RT-qPCR Probe Kit for CSFV (UNG Plus, Primer Free)

Code No. AG11749

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

### 产品概述

本产品是适用于探针法进行经典猪瘟病毒 (CSFV) 检测的专用试剂盒。反转录和 qPCR 反应在同一管内完成, 操作简单、快捷, 可有效降低污染风险。

本产品采用了反应性能优越的 *Evo M-MLV* 反转录酶和 *Accurate Taq* HS DNA 聚合酶, 配合精心优化的 Buffer, 可以在短时间内合成 cDNA 并进行高效稳定的 qPCR 扩增, 非常适合经典猪瘟等 RNA 病毒检测。

本产品中引入了 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 for CSFV (Probe)	1.25 ml X 2 pcs
One Step Enzyme Mix III *	400 $\mu$ 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。

### 实验操作

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

#### 反应体系<sup>1</sup>

组分名称	终浓度	加入量
2X One Step RT-qPCR Buffer for CSFV (Probe)	1X	12.5 $\mu$ l
One Step Enzyme Mix III	-	2 $\mu$ l
Primer F (50 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ M <sup>2</sup>	0.2 $\mu$ l
Primer R (50 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ M <sup>2</sup>	0.2 $\mu$ l
Probe( 50 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ M <sup>3</sup>	0.2 $\mu$ l
ROX Reference Dye ( 4 $\mu$ M ) <sup>4</sup>	0.08 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l
Template	-	$\leq$ 100 ng <sup>5</sup>
RNase free water	-	up to 25 $\mu$ 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 0.4  $\mu$ M, 也可根据实际需求在 0.2 ~ 1.0  $\mu$ M 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  $\mu$ M, 可根据实际需求在 0.1 ~ 0.8  $\mu$ M 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  $\mu$ l 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。

#### RT-qPCR 反应条件\*1 (以两步法扩增为例)

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

\*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)。

#### ➤ 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	72°C	30 sec	

详细信息请查阅 [www.agbio.com.cn](http://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.