

Evo M-MLV一步法RT-qPCR预混液(SYBR, UNG Plus)

Evo M-MLVOne Step RT-qPCR Mix (SYBR, UNG Plus)

Code No. AG11763

包装量: 250 rxns / 20 μl

保存温度: -20°C

产品概述

本产品是使用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行一步法 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。本产品使用了新型耐热、延伸能力强的 *Evo Super M-MLV* 反转录酶，整合新型 *Accurate Super Taq HS* 聚合酶的优越性能，适用性广，可用于各种模板的扩增，在短时间内即可高效合成 cDNA 并高效稳定地进行 qPCR 扩增。

本产品中还引入了 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，提高实验结果的准确性。

产品组成

2X One Step RT-qPCR Premix (SYBR, UNG Plus) ¹	1.25 ml x 2 pcs
RNase free water	1 ml x 3 pcs

*1: 该溶液中含 SYBR 染料，请避光保存。

保存及运输

保存温度: -20°C 保存

运输温度: 干冰运输或者 -20°C 冰袋运输

注意事项

1. 请仔细阅读所用定量 PCR 仪器设备操作手册，根据仪器操作手册进行操作。
2. 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。
3. 本产品含有 SYBR Green I，因此操作过程中要注意避免强光照射。
4. 本产品在 -20°C 存放时可能会产生淡黄色的沉淀，属于正常现象，使用前可放冰上溶解，充分颠倒混匀至沉淀全部消失。
5. 本产品为防止酶活降低，请勿涡旋振荡混匀，尽量避免反复冻融；使用前可上下颠倒混匀，同时避免产生过多气泡导致反应液配制时体积产生误差。
6. 所有反应混合液需要在冰上配制。需要同时进行数次反应时，应先配制各种试剂的混合液，然后分装到每个反应管中。
7. **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) 配制PCR反应液¹

组分名称	20 μl 体系 ¹	50 μl 体系 ¹
2X One Step RT-qPCR Premix (SYBR, UNG Plus)	10 μl	25 μl
Primer F (10 μM) ²	0.8 μl	2 μl
Primer R (10 μM) ²	0.8 μl	2 μl
ROX Reference Dye (4 μM) ³	0.4 μl	1 μl
Template ⁴	≤ 100 ng	≤ 250 ng
RNase free water	up to 20 μl	up to 50 μl

*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 μM，也可以在 0.2~1.0 μM 范围内调整。

*3: 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。

*4: 在 20 μl 体系里，RNA 模板添加量通常不高于 100 ng；在 50 μl 体系里，RNA 模板添加量通常不高于 250 ng。必要时可以进行梯度稀释，以确定合适的模板添加量。

2) RT-qPCR 反应条件^{*1} (两步法 PCR 反应程序)

步骤	温度	时间	循环数
UNG处理	25°C	0 ~ 5 min ^{*2}	1
反转录	50°C ^{*3}	5 min ^{*3}	1
预变性	95°C	30 sec ^{*4}	1
变性	95°C	5 sec	40
退火和延伸 ^{*6}	60°C	30 sec ^{*5}	
熔解曲线采集 ^{*7}	95°C	15 sec	1
	60°C	1 min	
	95°C	1 sec	

*1: 请参照仪器操作手册设置反应条件。

*2: 建议在 25°C, 5 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 0 ~ 5 min 范围内调整处理时间。

*3: 反转录反应在 50°C, 5 min 条件下可以得到较好的结果; 如模板较复杂可以将反转温度提升至 55°C, 反转时间也可根据实际情况在 3 ~ 10 min 范围内调整, 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, 可以延长预变性时间至 1 ~ 2 min。

*5: PCR 扩增产物建议设计在 80 bp ~ 150 bp, 可延长至 300 bp, 扩增延伸反应条件设定为 60°C、30 sec 时通常情况下可以满足要求; 如需快速检测, 可根据需求缩短延伸时间, 延伸时间可在 10 ~ 30 sec 进行调整测试; 如需提高反应特异性, 可适当提高退火温度; 如需提高扩增效率, 或者 PCR 扩增产物较长, 则可将反应延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。

*6: 此步骤进行荧光信号值采集。

*7: 此步为必须步骤, 此熔解曲线为 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems Standard 模式下默认程序。但仪器类型不同, 熔解曲线采集程序不尽相同, 使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。

3) 反应结束后确认扩增曲线是否正常, 熔解曲线是否单一, 并进行标准曲线分析。

➤ 附录1: 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;

● 需要添加 ROX Reference Dye (20 μM) (AG11703) 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) (AG11710) 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™.