

Evo M-MLV一步法RT-qPCR试剂盒 (探针法)

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

Code No. AG11708

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

保存温度: -20 $^{\circ}$ C

运输温度: 干冰或者 -20 $^{\circ}$ C 冰袋运输

产品组成

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

*1: 含有 dNTP Mixture 与反应 Buffer。

*2: 含有 *Evo M-MLV* 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 和 *Pro Taq* HS DNA Polymerase 甘油浓度较高, 使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部, 减少损失, 并用移液枪轻轻吸打混匀 (避免起泡), 再进行使用。
3. 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。
4. 2X One Step RT-qPCR Buffer (Probe) 溶解后如有不溶物请充分混匀至沉淀全部消失。
5. 本产品中不含探针。
6. 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 7500 Real-Time PCR System 为例)^{*1}

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

- *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 0.2 μM ，也可以在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整。
- *3: 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。
- *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 的 PCR 仪，ROX Reference Dye 可使用 RNase free water 代替。
- *5: 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。

RT-qPCR 反应条件^{*1} (两步法 PCR 反应程序)

步骤	温度	时间	循环数
Step 1	42°C ^{*2}	5 min ^{*2}	1
Step 2	95°C	30 sec ^{*3}	1
Step 3	95°C	5 sec	} 40
	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 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。
- *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: PCR 扩增产物通常设计在 300 bp 以下，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。

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.

➤ 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：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) (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™。