

Evo M-MLV一步法 RT-qPCR 预混液 (适用于猪蓝耳病毒检测, 含UNG, 不含引物探针)

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

Code No. AG11755

包装量: 500 rxns / 20 μ l
保存温度: -20 $^{\circ}$ C

产品概述

本产品是一款适用于猪蓝耳病毒 (PRRSV) 检测的2X Premix 型探针法试剂盒, 反转录、qPCR在同一反应体系内完成, 反应液配制十分简单、快捷, 仅需加入引物、探针、模板及RNase free water 即可进行qPCR反应, 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, 非常适合猪蓝耳等 RNA 病毒检测。

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; 同时, 本产品中混合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 Probe Premix for PRRSV (UNG Plus, Primer Free) ^{*1, *2}	1 ml X 5 pcs
RNase free water	1 ml X 5 pcs

*1: 含有 *Evo M-MLV* RTase Enzyme、*Accurate Taq* HS DNA Polymerase、UNG Enzyme、RNase Inhibitor、dNTP Mixture 与反应 buffer 等。

*2: 该溶液甘油浓度较高, -20 $^{\circ}$ C 保存不会冻结, 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, 并用移液器轻柔吸打混匀 (避免起泡), 然后再进行使用。

实验操作

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

反应体系^{*1}

组分名称	终浓度	加入量
2X One Step RT-qPCR Probe Premix for PRRSV (UNG Plus, Primer Free)	1X	10 μ l
Primer F (50 μ M)	0.4 μ M ^{*2}	0.16 μ l
Primer R (50 μ M)	0.4 μ M ^{*2}	0.16 μ l
Probe (50 μ M)	0.4 μ M ^{*3}	0.16 μ l
ROX Reference Dye (4 μ M) ^{*4}	0.08 μ M	0.4 μ l
Template	-	\leq 100 ng ^{*5}
RNase free water	-	up to 20 μ l



- *1: 请按照不同仪器推荐反应体系配制反应液。
- *2: 引物推荐使用终浓度为 $0.4\ \mu\text{M}$ ，也可根据实际需求在 $0.2 \sim 1.0\ \mu\text{M}$ 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 $0.4\ \mu\text{M}$ ，可根据实际需求在 $0.2 \sim 1.0\ \mu\text{M}$ 范围内进行调整。
- *4: 若需要使用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 $20\ \mu\text{l}$ 体系里，RNA模板添加量通常不高于 $100\ \text{ng}$ 。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（两步法PCR反应程序）

步骤	温度	时间	循环数
UNG 处理	25°C^{*2}	$10\ \text{min}^{*2}$	1
反转录	50°C^{*3}	$15\ \text{min}^{*3}$	1
预变性	95°C	$30\ \text{sec}^{*4}$	45
变性	95°C	5 sec	
退火和延伸 ⁶	60°C^{*5}	$30\ \text{sec}^{*5}$	

- *1: 请参照仪器操作手册设置反应条件。
- *2: 建议在 25°C ， $10\ \text{min}$ 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 $5 \sim 10\ \text{min}$ 范围内调整处理时间。
- *3: 反转录反应在 50°C ， $15\ \text{min}$ 条件下可以得到较好的结果；同时，也可根据实际需求在 $5 \sim 15\ \text{min}$ 范围内调整反转录反应时间，以得到理想的实验结果。

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.

- *4: 预变性时间通常设定为 $30\ \text{sec}$ ，如果模板变性困难，可根据实际需求在 $30\ \text{sec} \sim 5\ \text{min}$ 调整预变性时间。
- *5: 通常情况下PCR扩增产物设计在 $300\ \text{bp}$ 以下，扩增退火和延伸反应条件设定为 60°C 、 $30\ \text{sec}$ 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）。
- *6: 此步骤进行荧光信号采集。

➤ 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	$10\ \text{min}$	1
反转录	50°C	$15\ \text{min}$	1
预变性	95°C	$30\ \text{sec}$	45
变性	95°C	5 sec	
退火	55°C	$30\ \text{sec}$	
延伸 ^{*1}	72°C	$30\ \text{sec}$	

- *1: 此步骤进行荧光信号采集。