

## QD One Step RT-PCR PreMix (探针法) (单管型) UNG/dUTP

### 使用说明书

#### 【规格】

QDpro One Step RT PCR Mix (1ml) 100T: 货号: A2010A006;

QDpro One Step RT PCR Mix (5ml) 500T: 货号: A2010A006L;

#### 【前言】

本产品提供了一个灵敏、高效、快速地扩增并检测RNA的完整系统。One Step RT-PCR preMix包含所有RT-PCR所需的、并经优化的Reaction Buffer、RT酶混合物等，使用者只需加入适量的引物、探针和待检样品，即可进行One Step RT-PCR检测。

本产品使用高效率M-MLV反转录酶和化学修饰的热启动Taq DNA聚合酶，为RT-PCR反应提供了更高的产量及灵敏度、特异性。

采用的UNG/dUTP系统为PCR防污染系统；本产品使用的UNG酶常温即可起作用，不需要设置专门的反应温度。

本产品适用于开放型数字PCR仪，用户可参考推荐的扩增程序，根据实验结果自行摸索最佳扩增程序。

本产品适用于lncRNA, microRNA, RNA病毒检测进行一步法RT-qPCR探针法实验。

试验前应准备好用于检测目的基因的引物、探针。引物、探针应用HPLC或PAGE纯化。

本产品可用于多重荧光探针法的qPCR检测。

#### 【用户需要准备的其他物品】

1. 实验用水：使用DEPC处理的PCR用纯水。
2. 待检样品：总RNA, mRNA, 或者其他RNA;
3. RNase free & DNase free 的tip头, 离心管, 薄壁PCR管等;
4. 各种规格的移液器;
5. Real time PCR仪：本产品适用于下列Real time PCR仪：ABI PRISM®7700、7500、7300、7000、Q3, Q5, Q7, BIORAD iCycler、Roch Light Cycler 480等Real time PCR仪上使用，具体使用方法请参照相应仪器的说明书。

#### 【反应液配制】

反应液组份	加量 (μl)	终浓度	备注
QD RT-PCR mix	10	1X	
上游引物 (25uM)	0.3	0.3uM	用户自备
下游引物 (25uM)	0.3	0.3uM	用户自备
探针 (25uM)	0.15	0.15uM	用户自备
待检样品	5-9	10pg~100ng	用户自备
DEPC H <sub>2</sub> O	补足		用户自备
总体积	20ul		

注：1. 常初次使用本试剂时，可用引物浓度 300nM, 探针浓度 150nM 进行实验，根据实验结果具体情况，在 200~1000nM范围内调整引物浓度，在 50~400nM 范围内调整探针浓度以达到最佳检测效果。

2. 引物、探针、待检样品的具体加量用户可以根据实际情况调整，同时增减 DEPC 水用量，保证总反应体积不变即可。

3. 系统中不含oligo dT和随机引物，检测microRNA 请自行添加茎环引物；DEPC 水调整体积。

**【RT-PCR 扩增检测】**

- 1 将反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。
- 2 循环参数设定（请参照各类仪器的操作说明进行设置）

步骤	温度（℃）	时间	循环数（次）
1	50	5-15分钟	1
2	<b>95</b>	<b>5 分钟</b>	<b>1</b>
3	95	5 秒	40-45
4	60	30秒	
步骤 4 中 60℃时荧光检测，检测通道：FAM/HEX/VIC/ROX/CY5			

注：以上扩增条件为实例，用户应根据引物的 **Tm** 值及扩增片段的大小来确定适合的变性时间、退火温度，退火时间和循环次数，**黑体字部分必须保留**。

**【保存条件】**

本产品原则上在-20℃以下冷冻保存，避免反复冻融。如果在短期内需持续使用时，融解后可在4℃保存，最长可保存1周。

**【注意事项】**

1. 本产品为研究用试剂。请勿作为诊断、临床试剂用。
2. **为保证实验结果的准确性和可靠性，请注意以下事项：**
  - 1) 实验室应严格分区，避免 PCR 产物污染。
  - 2) 各组分使用前 2-8℃解冻，室温平衡十五分钟；
  - 3) 实验全过程严防 RNA 酶污染及 RNA 降解；使用已校准的移液器，选用进口一次性使用的 PCR 反应管、离心管、tip 头等进行样本处理及配液等操作，所有用具应不含DNA 酶和RNA 酶。实验样品尽可能新鲜，提取过程应严防RNA 酶污染及操作不当导致的RNA 降解。
  - 4) 斜体字部分时间和温度很重要，不得更改；
  - 5) 根据具体实验结果，建议引物浓度在 0.1-1uM 之间调整，探针浓度在 0.05-1uM 之间调整；
  - 6) 建议使用 10 pg~100 ng 的 Total RNA 为模板；
  - 7) 反转录时间可以根据模板具体情况进行调节，建议不要低于 5分钟；
  - 8) 60 度是荧光定量 PCR 常用的退火温度，需要根据引物、探针设计的具体情况来确定，如退火温度低于 58 度，建议采用三步法扩增 40-45 个循环；延伸时间可根据使用仪器所需要的数据采集最短时间限制自行调整。
  - 9) 本产品使用的 UNG 酶常温即可起作用，不需要设置专门的反应温度。
  - 10) **本产品适用于开放型数字PCR仪**，用户可参考推荐的扩增程序，根据实验结果自行摸索最佳扩增程序。
  - 11) 本产品-15~-20℃保存 18 个月，2-8℃保存 1 周产品性能不受影响。
  - 12) 引物、探针设计过程中应尽可能避免发夹结构、二聚体等现象的发生，探针的位置尽可能靠近上游引物，PCR目标片段最好小于200bp，尽可能在150bp以内。
  - 13) 统一配液后分装以减少加样误差，每次实验应设置阴性对照。
  - 14) 禁止标记PCR 反应管，避免外源性荧光信号干扰。
  - 15) PCR 反应管中不能有气泡，否则会产生非特异的荧光信号。若有气泡，可先用手指将气泡弹破，然后再低速离心消除。
  - 16) 实时荧光PCR 仪器连续进行实验时，最好间隔一小时以上再使用。实时荧光PCR 仪需经常校正和清洁载样板板孔。

品质保证：

所有产品由Biotnt 进行品质保证。

如果客户使用中有任何问题，都可以联系Biotnt 公司。

电话： 4008801880 或 0086 21 51692391 传真： 0086 21 51692391

Email: [sales@biotnt.com](mailto:sales@biotnt.com)

主页： [www.biotnt.com](http://www.biotnt.com)

