ABScript III One Step RT-qPCR Probe Kit with UDG V5

目录： RK20412-1000RXN
规格： 1000 RXN (20 μL/RXN)
浓度： 200,000 U/mL
产品组成：

2X One Step RT-qPCR Probe Buffer IV	RM21475
One Step Probe Enzyme Mix IV	RM21476

产品说明

ABScript III One Step RT-qPCR Probe Kit with UDG V5 是采用探针法进行 RT-qPCR 反应的通用款试剂盒。本试剂盒以 RNA 为模板，使用基因特异引物，逆转录和 PCR 反应可在同一管内连续进行，不需要额外的开管、移液等操作，大大提高了检测通量。本试剂盒引入 dUTP/UDG 防污体系，热敏感 UDG 在室温下就可将含 U 的污染物迅速降解，50℃逆转录时热敏 UDG 迅速失活，不会影响 RT-qPCR 的效率和灵敏度。本反应体系可以对扩增产物进行实时检测，大大提高了检测灵敏度，并且省略了 PCR 反应后的电泳步骤，非常适合于 RNA 病毒等微量 RNA 的检测。本制品使用适合 RT-qPCR 的新型逆转录酶 ABScript III Reverse Transcriptase 高效合成第一链 cDNA，搭配使用探针和 Taq DNA Polymerase，配合经过优化的缓冲体系，具有高扩增效率和高扩增灵敏性，能稳定高效的进行一步法 RT-qPCR 反应。

产品规格及组分：

组分	1000 RXN (20 μL 体系/ RXN)
2X One Step RT-qPCR Probe Buffer IV*	10 mL
One Step Probe Enzyme Mix IV**	2 mL

**含有 dNTP/dUTP Mix，通过添加 UDG 能够防止因交叉污染而导致的假阳性发生。*

*** 使用了抗 DNA 聚合酶的抗体，采用热启动体系，含有 RNase Inhibitor，Heat-labile UDG*

保存条件

-20℃保存

适用机型：

类型	仪器
无需添加 ROX 参比染料	Bio-Rad iCycler 系列, Roche Light Cycler 系列, Qiagen/Corbett 系列等
50X ROX Dye I (High Rox)	ABI 7000/7300/7700/7900, ABI StepOne/StepOnePlus 等
50X ROX Dye II (Low Rox)	ABI 7500, ABI ViiA™7, ABI QuantaStudio 系列, Stratagene 系列,Corbett Rotor Gene 3000 等

注意事项

1. 使用 2X One Step RT-qPCR Probe Buffer IV 时，请充分融解，混匀后使用，避免强光直射。若同时需要配制多个 One Step RT-qPCR 反应时，应配制各种试剂的混合液，然后再分装到每个反应管，减少试剂损失。
2. 试剂盒中的 One Step Probe Enzyme Mix IV 含有高浓度甘油，在使用前请轻轻混匀，避免起泡；分取之前请瞬时离心收集到管底后使用，使用后立即放回-20℃冰箱保存。
3. 反应液的配制和分装一定使用无污染的枪头、Microtube，尽量避免污染。
4. 为保证反应的成功，建议使用高质量的 RNA 模板。
5. 本试剂盒只能使用特异性引物，不能使用随机引物或 Oligo dT 引物等进行反转录反应。
6. 一步法 RT-qPCR 实验设计用于扩增的引物时，推荐扩增产物长度在 70~200 bp，效果最佳。

操作说明

实验准备：

- 1.5 mL RNase-free EP 管、RNase-free PCR 管、移液器和枪头、冰盒或冰。
- PCR 探针、引物与模板。
- 荧光定量 PCR 专用管或平板。

Order: order@abclonal.com
Tech: support@abclonal.com
For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com for a complete listing of recommended products.

实验方法：

用户需自备的试剂：RNA 模板、引物、探针。请按照不同品牌荧光定量 PCR 仪的使用说明书要求进行实验操作。

1. 配制 One Step RT-qPCR 反应体系：

推荐冰上配制反应体系， 以 20μL 反应体系为例：

组分	加入体积	加入体积
2X One Step RT-qPCR Probe Buffer IV	10 μL	25 μL
One Step Probe Enzyme Mix IV	2 μL	5 μL
正向引物(10 μM) *	0.4 μL	1 μL
反向引物(10 μM) *	0.4 μL	1 μL
TaqMan Probe (10 μM) ***	0.4 μL	1 μL
50X ROX Dye	0.4 μL	1 μL
Total RNA **	2 μL	5 μL
Nuclease-free H_2O	to 20 μL	To 50 μL

** 通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果，反应性能较差时，可以在 0.1-1.0 μM 范围内调整引物浓度。扩增产物的长度建议选择在 70~200 bp 范围内。*

*** 建议在 20 μL 的体系中加入 10 pg~100 ng 的 Total RNA 为模板。*

**** 探针浓度可在 50-250 nM 内进行调整*

2. 推荐的 One Step RT-qPCR 反应程序：

步骤	温度	时间	循环数（Cycles）
（UDG）反应	25℃	5 min	1
反转录	50℃	5 min	1
预变性	95℃	3 min	1
循环反应	95℃	5-15 s	45
	60℃	30~34 s	

延伸时间请根据您使用的 Real Time PCR 仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用 StepOnePlus 时请设定为 30 s；使用 7300 时请设定为 31 s；使用 7500 时请设定为 34 s。

3. 反应结束后确认 Real Time PCR 扩增曲线，进行标准曲线制作等。

4. 试验示例

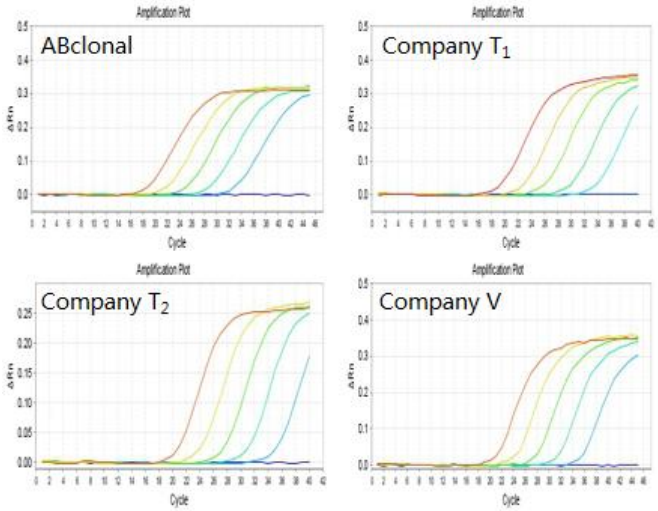

图 1：以小鼠 RNA 为模板(100 ng/μl 为起始浓度)，5'端 TAMRA 荧光标记探针，10 倍梯度稀释，能很好的检测出目的基因，同其他厂家产品相比具有较高的检测灵敏性。

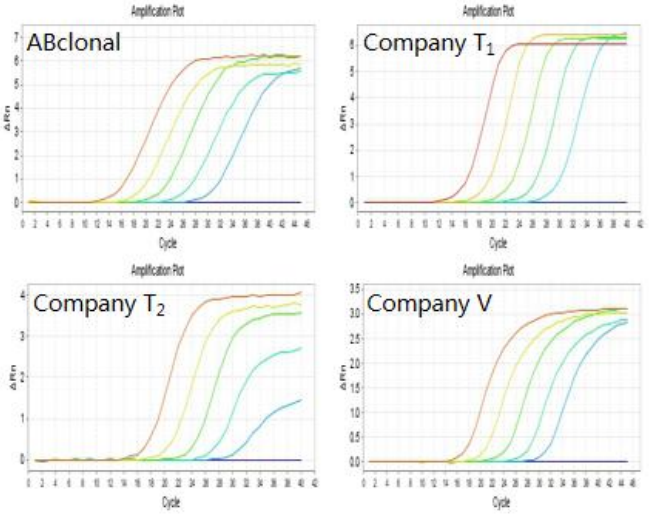

图 2：以人 RNA 为模板(100 ng/μl 为起始浓度)，5'端 FAM 荧光标记探针，10 倍梯度稀释，能很好的检测出目的基因，同其他厂家产品相比具有较高的检测灵敏性。

Order: order@abclonal.com
Tech: support@abclonal.com
For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com for a complete listing of recommended products.