

## 2X One Step Prime RT-qPCR Mix

### (冻干粉)

货号: V5007L, V5008L

#### 产品组成

Component	V5007L (200 rxn, 25 $\mu$ l/rxn)	V5008L (5000 rxn, 25 $\mu$ l/rxn)
One Step Prime RT-qPCR Enzyme Mix (Lyophilized) *	100 rxn $\times$ 2	100 rxn $\times$ 50
Enzyme Mix Buffer (2X)	1.25 ml $\times$ 2	1.25 ml $\times$ 50

\*包含逆转录酶, RNase 抑制剂, 热敏 UDG 酶, 热启动 DNA 聚合酶, dNTPs 包含 dUTP。

#### 保存条件

2~8°C

#### 产品简介

2X One Step Prime RT-qPCR Mix 是用于一步法多重荧光定量 PCR 的试剂。它以探针和特异性引物来定量检测 RNA 或 DNA 靶标序列。优化的缓冲液组分可以协助在一个体系内完成多达 4 个 RNA 或 DNA 序列的多重定量 PCR。该混合液以 2 倍浓度提供, 能够加入更多的模板进行反应, 从而提高检测的灵敏度。冻干的 One Step Prime RT-qPCR Enzyme Mix 试剂将耐热逆转录酶、热启 Taq DNA 聚合酶、热敏 UDG 酶、dNTPs 等做成冻干品试剂, 制品性能更稳定, 可长期保存。

#### 应用举例

##### 1. 准备 Master Mix:

取出冻干的 One Step Prime RT-qPCR Enzyme Mix, 平衡至室温后取 1 支冻干粉溶解于 1.25 ml Enzyme Mix Buffer 中, 避免产生气泡。吹打清洗管壁, 防止冻干粉残留。将管子放在一边静置 30 min。

注意: 重悬的 Master Mix 可以在 -20°C 保存 1 年, 4°C 保存 7 天。

##### 2. 准备反应体系

2.1 按下表于冰上配置反应体系。于冰上融化所有试剂。配制多个反应孔时, 请为各组分预留 10% 的余量, 以免移液损失。

2.2 反应体系配好后, 用光学贴膜覆盖反应板, 充分翻转混匀, 离心。

快速反应体系:

组分	体积	终浓度
重悬的 Master Mix	12.5 $\mu$ l	1X

引物-探针	1 $\mu$ l	引物: 400-900 nM 探针: 100-250 nM
样品*	根据需要调整	1 pg-100 ng
RT-PCR 级超纯水	根据需要调整	-
总体积	25 $\mu$ l	

标准反应体系:

组分	体积	终浓度
重悬的 Master Mix	25 $\mu$ l	1X
引物-探针	2 $\mu$ l	引物: 400-900 nM 探针: 100-250 nM
样品*	根据需要调整	1 pg-100 ng
RT-PCR 级超纯水	根据需要调整	-
总体积	50 $\mu$ l	

\* DNA 或 RNA 样本均可, 逆转录反应并不会对 DNA 样本造成影响。

#### 3. 运行 RT-qPCR 反应程序

快速反应体系:

步骤	阶段	循环数	温度	时间
逆转录	1	1	55°C *	10 min
预变性	2	1	95°C	2 min
扩增	3	45	95°C	5 sec
			60°C	30 sec

标准反应体系:

步骤	阶段	循环数	温度	时间
逆转录	1	1	55°C *	10 min
预变性	2	1	95°C	2 min
扩增	3	45	95°C	15sec
			60°C	60 sec

\* 逆转录反应的温度可以在 48°C 至 55°C 之间进行调整。

#### 4. 实验数据分析

针对不同的仪器类型, 数据分析也略有不同。一般情况下, 数据分析主要包括:

1. 观察扩增曲线, 根据需要进行设置, 比如:

a. 设置合适的基线和阈值线

b. 将一些典型的异常值从分析中剔除掉

2. 在孔位表或者结果表中, 观察复孔之间的 Ct 值是否有差异;

3. 对于绝对定量, 观察标准曲线的斜率、扩增效率、R<sup>2</sup> 值、截距、Ct 值和异常值。

本品仅供科学研究使用。