

# UltraScript Probe One-Step qRT-PCR Kit

## 使用说明书

版本号: 240220

产品组成:

Components	QP201-01 (125次*20uL)	QP201-02 (500次*20uL)
2× qRT-PCR Probe Mix(Non ROX)	1.25mL	4*1.25mL
UltraScript One-Step Enzyme Mix	100μL	400μL
ROX Reference(100X)	25uL	25uL
RNase-free Water	1.5mL	1.5mL

**产品储存:** 2-8°C运输, -20°C保存, 保质期24个月。使用前充分融解混匀, 短期使用可放在4°C存放2周。

**适用范围:** 可用于高拷贝、低拷贝基因的检测。部分高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板。

**制品说明:**

本试剂盒是采用探针法进行一步法反转录实时荧光定量检测的专用试剂盒。以提取的RNA为模板, 在同一反应管内连续进行反转录和荧光定量检测, 操作简单, 并能有效防止污染、降低加样误差。基于高效反转录酶、热启动聚合酶、配合优化的Buffer体系, 可用于高拷贝、低拷贝基因的检测, 对于二级结构复杂或GC含量高的RNA模板扩增效果好, 非常适合RNA病毒等微量目标基因的检测。

本试剂盒使用时只需加入模板、引物、探针、ROX Reference Dye(用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差, 根据不同荧光定量PCR仪选择使用)和水, 使其工作浓度为1×, 即可快速进行反应, 操作便捷, 可最大限度地减少人为误差、节省PCR实验操作时间和降低污染概率。本产品具有灵敏度高、特异性强、稳定性好和数据准确等优点。

本试剂盒含独立包装参比染料ROX Reference Dye储存液, 浓度为50μmol(100×), 使用终浓度根据不同仪器为500nmol(1×, 高浓度)或者50nmol(0.1×, 低浓度), 用户可以根据不同型号PCR仪器的推荐使用浓度添加到荧光定量PCR反应体系内进行使用。ROX主要用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。客户可根据qPCR仪器技术指导自行决定是否添加和需要添加的浓度。

**ROX快捷用法:** 直接将ROX(100×)加入荧光定量Mix中配成含ROX工作液使用。

- 需要高浓度ROX (ROX终浓度为1×): 使用前, 按照1.25mL体积2× qRT-PCR Probe Mix加入25μL体积ROX Reference Dye的比例加入, 充分混匀后, 可以直接使用。
- 需要低浓度ROX (ROX终浓度为0.1×): 使用前, 按照1.25mL体积2× qRT-PCR Probe Mix加入2.5μL体积ROX Reference Dye的比例加入, 充分混匀后, 可以直接使用。

**建议PCR条件: (以20μL和50μL反应体系为例, 反应液配制请在冰上进行)**

根据下表冰上配制反应液: 2× qRT-PCR Probe Mix 使用前充分溶解并颠倒混匀(避免剧烈涡旋震荡产生过多气泡), 短期频繁使用可放4℃存放2周。

Components	Volume(20μL)	Volume(50μL)	Final Concentration
RNA Template	× μL	× μL	as required
Forward Primer (10μM)	0.5μL	1.25μL	0.2μM each
Reverse Primer (10μM)	0.5μL	1.25μL	0.2μM each
Probe (10μM)	0.5μL	1.25μL	0.2μM each
2× qRT-PCR Probe Mix (Non ROX)	10μL	25μL	1×
UltraScript One-Step Enzyme Mix	0.8μL	2μL	-
ROX Reference(100X)	0μL/0.02μL/0.2μL	0μL/0.02μL/0.2μL	≤1μg
ddH <sub>2</sub> O to final volume	20μL	50μL	Not applicable

**注:** 引物浓度请以终浓度0.2-0.6μM作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下, 可提高引物的浓度; 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度, 由此优化反应体系。探针浓度可根据具体情况在50-300nM间调整。

**注:** UltraScript One-Step Enzyme Mix含甘油很粘稠, 溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失, 用前请点甩离心后使用, 并且避免吸头插入液面太深, 导致吸头外壁沾附损失。UltraScript One-Step Enzyme Mix内包含的酶均为过量, 即使每次按照7.2μL-7.6μL使用, 也不影响使用效果。

**PCR 循环(二步法):**

50°C: 15-30 min

94°C: 2-3 min

94°C: 15 sec

60°C: 30-60 sec

35-45 cycles

Dissociation Stage

**PCR 循环(三步法):**

50°C: 15-30min

94°C: 2-3 min

94°C: 15 sec

55-60°C: 15 sec

72°C: 30 sec

35-45 cycles

Dissociation Stage

**说明：**本制品兼容性强，适用于不同厂家、型号的荧光定量PCR仪，绝大多数情况下使用二步法和三步法均可获得良好效果。在实际使用中可以根据机型推荐和具体情况对程序加以微调。一般来说，二步法扩增特异性高，三步法扩增效率高。当二步法扩增效率不好时，建议选择三步法进行PCR扩增。

**注意事项：**

1. 操作中注意避免RNase污染，为保证反转录成功，建议使用高质量的RNA模板。
2. 不同的片段，所需最佳RNA模板用量不同，过多的RNA模板会抑制反应，建议根据实验情况调整RNA模板用量。
3. 本试剂盒适用于以基因特异性引物扩增目的基因，不能使用Oligo(dT)和Random Primer进行反应。
4. Probe的工作浓度会影响CT值，请根据实验结果确定Probe的最佳用量。
5. 同时需要进行数次qRT-PCR反应时，应先配制各种试剂的混合液，然后再分装到每个反应管中。这样可使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失，避免重复分取同一试剂，同时也可以减少实验操作误差或实验样品之间产生的误差。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
7. 本产品仅供科研使用，严禁用于临床诊断和药物等用途。

=====

