

Direct One-step Probe RT-qPCR Kit

货号规格

货号	V5014-A
50- μ l 反应数	1,000 rxns

产品简介

Direct One-step Probe RT-qPCR Kit 是免核酸提取的一步法探针法 RT-qPCR 预混试剂，Direct One-step Enzyme Mix 包含经优化的逆转录酶、抗体修饰热启动 Taq 以及温敏型 UDG 酶，在室温下即可清除 DNA 污染，在逆转录阶段失活。本品具有极强的抑制物耐受性，可直接用于多种血液样本、拭子、唾液等样本的靶基因检测。本品兼容多重荧光 PCR 系统，支持快速程序，适用于病原体检测、基因表达分析等科研和 IVD 开发应用。

产品组成

Component	V5014-A
2X Direct One-step Buffer ^[1]	25 mL
25X Direct One-step Enzyme Mix ^[2]	2 mL

[1] 包含 dNTP/dUTP mix, Mg²⁺。

[2] 包含温敏型 UDG, Reverse Transcriptase, 热启动 Taq DNA Polymerase。

保存条件

-20°C。

应用范围

RNA 病毒样本、肿瘤样本直扩检测 IVD 产品开发，多重靶标 RNA 一步法 RT-qPCR 实验等。

质量控制

纯度检测：经质量检测，产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测：经不同来源的模板和引物检测，产品具有优秀的特异性、灵敏性及可重复性等。

应用举例

1. 准备反应体系

充分混匀各试剂，参照下表配制反应体系：

Component	50 μ l-rxn	Final Conc.
2X Direct One-step Buffer	25 μ l	1X
25X Direct One-step Enzyme Mix	2 μ l	1X

Primer Probe Mix ^[1]	2 μ l	-
Sample ^[2]	Variable	-
RNase-free ddH ₂ O	to 50 μ l ^[3]	-

[1] 引物的终浓度最佳范围是 0.1~1.0 μ M。通常情况下，0.2 μ M 的引物效果良好。探针的终浓度最佳范围是 0.1~0.3 μ M。

[2] 建议用无核酸酶的超纯水或 TE 缓冲液稀释样本后再加样，并通过测试确定不同样本的最佳加样量。部分样本建议加样量请参考下表：

样本	50 μ l-rxn 建议加样量	最大加样比例
抗凝全血	2.5 μ l	5%
血浆	10 μ l	30%
血清	10 μ l	30%
咽拭子	10 μ l	20%
唾液	10 μ l	20%

[3] 在保持加样量不变的情况下，通过加大反应体系 (≤ 100 μ l) 的方式来达到稀释样本的目的，可改善扩增抑制现象。

2. 运行 RT-qPCR 反应程序

参照下表设置反应程序：

Stage	Temp.	Time	Cycles
Reverse transcription	50°C ^[1]	10-20 min	/
Initial denaturation	95°C	1-5 min	/
Circular reaction	95°C	10-20 sec	40-45
	56-64°C	20-60 sec	

[1] 可在 42-55°C 温度范围及 5-30 min 时间范围内优化逆转录反应。

[2] 以下情况建议采用三步法扩增：引物退火温度较低、目标片段 > 200 bp、扩增效率较低。

本品仅供科学研究使用。