



WinScript One Step RT-qPCR U⁺ Kit

Cat. No. CW3346

产品简介

WinScript One Step RT-qPCR U⁺ Kit是采用探针法（TaqMan，Molecular Beacon等）进行一步法Real-Time RT-qPCR的专用试剂盒。使用本试剂盒进行Real-Time RT-qPCR反应时，逆转录和定量PCR在同一反应体系中进行，反应过程中无需添加试剂，无需打开管盖，避免污染的同时提高了实验效率。本试剂盒中引入了dUTP/UNG防污染系统，在室温下即可将含U的污染物迅速降解。本试剂盒的检测灵敏度高，荧光信号强，适合于RNA病毒等微量RNA及DNA/RNA检测。特殊的缓冲系统能使逆转录酶、双抗修饰的DNA聚合酶及RNA酶抑制剂同时发挥出最大功效，从而提高反应效率。使用本试剂盒可在多达6个对数级的动态范围内进行检测，对目的基因的定量更准确，重复性好，可信度高。

保存条件： -30~-15℃保存，如需频繁使用，Buffer可存放于2-8℃，尽量避免反复冻融。

运输条件： 干冰运输

产品内容

Component	CW3346S 200rxns	CW3346M 1000rxns
5×WinScript One Step RT-qPCR U ⁺ Buffer	1mL	5mL
WinScript One Step RT-qPCR U ⁺ Enzyme	200μL	1mL

使用说明

以下举例为常规qPCR反应体系和反应条件，实际操作中应根据具体用途、模板、引物结构、目的片段大小和扩增效果不同进行相应的改进和优化。

- 1. 将RNA模板、引物、5×WinScript One Step RT-qPCR U⁺ Buffer、WinScript One Step RT-qPCR U⁺ Enzyme溶解并置于冰上备用。
- 2. 根据下表配制反应体系，总体积为25μL。

试剂	25μL体系	终浓度
5×WinScript One Step RT-qPCR U ⁺ Buffer	5μL	1 ×
WinScript One Step RT-qPCR U ⁺ Enzyme	1μL	
Forward Primer, 10μM	0.5μL	0.2μM ¹⁾
Reverse Primer, 10μM	0.5μL	0.2μM ¹⁾
Probe	0.25μL	0.1μM ²⁾
RNA Template	XμL	10pg-100ng ³⁾
RNase-Free Water	up to 25μL	

注意:

- 1) 通常引物浓度以0.2μM可以得到较好结果，可以在0.1-1.0μM作为设定范围的参考。
 - 2) 使用的探针浓度，与使用的荧光定量PCR仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行浓度的调节。
 - 3) 通常RNA模板的量以10pg-100ng为参照，因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。
- 3. 混匀，短暂离心，将溶液收集至管底。
 - 4. RT-qPCR反应条件:

步骤	温度	时间	循环数
逆转录	55℃	5min	1
预变性	95℃	30s	1
变性	95℃	5s	} 45cycles
退火延伸，收集荧光	58℃ ¹⁾	30s	

注意:

建议采用两步法PCR反应程序，若因使用Tm值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法PCR扩增，退火温度请以 56℃-64℃的范围作为设定参考。

引物设计的一般性指南

- 1. 先设计探针，然后再设计引物。
- 2. 引物序列和探针序列不能有重叠。最佳引物长度为20个碱基。
- 3. 将GC含量保持在20-80%的范围内。
- 4. 避免运行相同核苷酸。如果无法完全避免重复，则必须保证连续的G碱基小于4个。
- 5. 确保 3’端的最后5个核苷酸包含最多两个G和/或C碱基。
- 6. 如果无法找到合适的引物序列，则可能需要检查靶序列，然后选择另一个扩增子位点或筛选更多的位点。

注意：Tm保持在56℃-64℃。

相关产品

Cat. No.	产品名称
CW2598	全能型植物RNA提取试剂盒（DNase I）
CW0597	超纯RNA提取试剂盒（DNase I）
CW3225	磁珠法病毒DNA/RNA提取试剂盒
CW2691	Blood RNA Storage Tube (PET, 5mL)
CWY076	样本保存液
CW2689	RNA Storage Tube