



SuperFast Lyo Probe One Step RT-qPCR U⁺ Mix

目录号：CW3378S (200 rxns)

CW3378M (1000 rxns)

保存条件：-30 ~ -15℃保存, 干冰运输。

产品内容

Component	CW3378S 200 rxns	CW3378M 1000 rxns
5×SuperFast Lyo Probe One Step RT-qPCR U ⁺ Mix	1 mL	5 mL
2.5×冻干保护剂	2×1 mL	2×5 mL
RNase-Free Water	1 mL	5 mL

产品简介

SuperFast Lyo Probe One Step RT-qPCR U⁺ Mix专为以RNA为模板(如RNA病毒)的定量PCR检测而设计。使用基因特异性引物(GSP)，逆转录和qPCR反应在一管内完成，不需要额外的开管/移液操作，大大提高了检测通量，并降低了污染的风险。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，不会影响RT-qPCR的效率和灵敏度。配合经过优化的缓冲体系和抗体修饰Taq酶以及突变后的M-MLV，SuperFast Lyo Probe One Step RT-qPCR U⁺ Mix的检测灵敏度可达到0.1 pg总RNA或<10拷贝的RNA模板且具有更高的热稳定性。试剂盒以便捷的Master Mix形式提供。5×SuperFast Lyo Probe One Step RT-qPCR U⁺ Mix包含优化的缓冲体系、Taq DNA聚合酶、逆转录酶和dNTP/dUTP Mix，尤其适用于TaqMan等荧光标记探针的高特异性、低模板浓度和多重快速检测。本品不含有甘油，可直接用于冻干试剂开发。

注意事项

- 1. 冻干保护剂可置于70℃水浴中融化备用。
- 2. 冻干保护剂长期保存可置于-20℃，如果在短期内需要频繁使用，可在2-8℃保存。
- 3. 使用前请在Mix完全融化后,上下颠倒轻轻混匀， 尽量避免起泡， 并经短暂离心后使用。避免反复冻融， ROX染料用于校正定量PCR孔间产生的荧光信号误差， 本品中不含ROX 染料， 如所使用仪器需匹配ROX染料,请联系当地业务或致电康为世纪客服， 电话 4006-222-360。

使用方法

1. PCR反应体系

试剂	25 μL体系	50 μL体系	终浓度
5×SuperFast Lyo Probe One Step RT-qPCR U+ Mix	5 μL	10 μL	1×
2.5×冻干保护剂	10 μL	20 μL	1×
Forward Primer, 10 μM	0.5 μL	1 μL	0.2 μM ¹⁾
Reverse Primer, 10 μM	0.5 μL	1 μL	0.2 μM
Probe ²⁾	0.25 μL	0.5 μL	0.1 μM
Template RNA ³⁾	X μL	X μL	
RNase-Free Water	Up to 25 μL	Up to 50 μL	

注意：1) 通常引物终浓度以0.2 μM可以得到较好结果，可以在0.1-1.0 μM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。

2) 所用探针的终浓度，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DNA模板的量以10-100 ng基因组DNA或1-10 ng cDNA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。

2. PCR反应条件
常规反应程序

步骤	温度	时间	循环数
逆转录	55℃	5 min	1
预变性	95℃	1 min ¹⁾	1
变性	95℃	5 s	} 40-45
退火/延伸	58℃ ²⁾	30 s ³⁾	

快速反应程序

步骤	温度	时间	循环数
逆转录	55℃	5 min	1
预变性	95℃	30 s ¹⁾	1
变性	95℃	2 s	} 40-45
退火/延伸	58℃ ²⁾	15 s ³⁾	

- 注意：1) 本产品所采用的酶在预变性95℃，30 s条件下实现酶的活化。在此条件下，大多数模板可良好的进行解链。对GC含量高、二级结构复杂的模板，可将预变性时间延长至1min，以使起始模板充分解链，若高温处理时间过长，会对酶的活性造成影响；对于简单模板也可采用预变性1-10 s，可根据模板情况确定最佳的预变性时间。
- 2) 建议采用两步法PCR反应程序，退火温度请以55-60℃作为设定范围的参考，发生非特异性反应时，可提高退火温度。若因使用Tm值较低的引物或者扩增产物过长等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法PCR扩增。
- 3) 实际使用的Real Time PCR仪是否支持快速扩增循环，初次尝试请进行预实验验证。

3. 冻干程序

阶段	步骤	温度	斜率时间	控温时间	真空度Pa	备注
预冷	1	0℃	——	30min	——	
预冻	2	-50℃	——	3h	——	常温最快速率降温
	3	-30℃	——	3h	14	可设置斜率
	4	-10℃	——	2h	14	时间，做斜率
升华干燥	5	0℃	——	1h	14	控制升温
	6	30℃	——	4h	14	

注意：1) 辅料配方发生微量的变化，需重新测定冻干参数，并做相应调整。

2) 冻干设备要求:

冷阱盘管表面温度≤-50℃

板层温度≤-45℃，温度均一性±1℃（性能详细说明及验证方案咨询康为技术人员）

可做压升测试（冻干生产前，做泄漏率测试）。

3) 环境要求：溶液分装及配置尽量在万级层流保护下进行，环境空间尘埃掉落进溶液中成为冻干过程的晶核，影响溶液的结晶的过冷度，导致产品质量不一致性。