



WinScript Lyo AD One Step RT-qPCR U⁺ Kit

目录号：CW3354S (1 mL)

CW3354M (5 mL)

保存条件：-30 ~ -15°C保存，避免反复冻融。

产品内容

Component	CW3354S	CW3354M
5×WinScript Lyo AD One Step RT-qPCR U ⁺ Mix	1 mL	5 mL
5×One Step冻干保护剂	1 mL	5 mL

产品简介

本产品是采用探针法 (TaqMan, Molecular Beacon等) 以RNA为模板进行一步法Real-Time RT-qPCR的试剂盒。使用本产品进行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, 避免了污染的同时提高了实验效率。本试剂中引入了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。本品已配冻干保护剂, 可以用于冻干试剂的制备。

注意事项

1. 本产品以RNA为模板进行一步法RT-PCR实验, 在操作过程中应避免RNase污染, 建议在专门的区域进行RNA操作, 使用专门的仪器和耗材, 操作人员戴口罩和一次性手套并经常更换手套, 实验相关耗材应用0.1% DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液在37°C处理12小时, 并高压灭菌30分钟后使用。
2. 本品避免反复冻融, 建议分装保存。
3. 5×One Step冻干保护剂融化后如有沉淀或结晶析出请于70°C水浴溶解, 不影响使用。

使用方法

以下举例为常规的反应体系和反应条件, 实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小的不同进行相应的改进和优化。

1. 将RNA模板、引物探针、5×WinScript Lyo AD One Step RT-qPCR U⁺ Mix、5×One Step冻干保护剂融化并置于冰上备用
2. PCR反应体系:

试剂	25 μL反应体系	终浓度
5×WinScript Lyo AD One Step RT-qPCR U ⁺ Mix	5 μL	1×
Primer/Probe mix ¹⁾	X μL	
5×One Step冻干保护剂	5 μL	1×
RNA Template ²⁾	5 μL	
Total	25 μL	

注意:

- 1) 通常引物浓度以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。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。
 - 2) 通常RNA模板的量以10 pg-100 ng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, 将溶液收集到管底。
4. RT-PCR反应条件:

步骤	温度 $^{\circ}\text{C}$	时间	循环数
逆转录	50	5 min	1
预变性	95	30 s	1
变性	95	5 s	45
退火延伸, 收集荧光	58	30 s	

备注: 退火延伸温度可根据引物探针自行调整。

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 $^{\circ}\text{C}$	10 min	30 min	--	常温最快速
预冻	2	-45 $^{\circ}\text{C}$	90 min	180 min	--	可根据包材调整保持时间
升华干燥	3	-30 $^{\circ}\text{C}$	90 min	180 min	14	可设置斜率时间 做斜率控制升温
	4	-10 $^{\circ}\text{C}$	120 min	120 min	14	
	5	0 $^{\circ}\text{C}$	60 min	90 min	14	
解析干燥	6	30 $^{\circ}\text{C}$	150 min	240 min	14	

1. 辅料配方发生微小的变化, 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 \leq -50 $^{\circ}\text{C}$

板层温度 \leq -45 $^{\circ}\text{C}$, 温度均一性 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ (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。

4. 出仓环境温湿度应作控制, 建议出仓温度在15~25 $^{\circ}\text{C}$, 湿度建议 \leq 30%。