



WinScript One Step RT-qPCR U⁺ Kit

目录号： CW3346S (200 rxns)
CW3346M (1000 rxns)

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。

产品内容

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

产品简介

本产品是采用探针法（TaqMan, MolecularBeacon等）进行一步法Real-Time RT-qPCR的专用试剂盒。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。本产品的检测灵敏度高，荧光信号强，信噪比高，非常适合于RNA病毒等微量RNA的检测。其所包含的特殊缓冲系统能使逆转录酶与DNA聚合酶同时发挥最大功效，提高反应效率。使用本产品可以得到更宽广的线性范围，对目的基因定量更准确，重复性好，可信度高。

注意事项

1. 本试剂盒中试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
2. 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℃处理12小时,并高压灭菌30分钟后使用。
3. 本试剂盒中的各试剂应尽量避免反复冻融，反复冻融可能使产品性能下降。
4. 本试剂盒必须使用特异性引物，引物的选择可根据具体实验来选择，引物设计的好坏直接影响到RT-qPCR反应的结果，设计引物时需考虑GC含量，引物长度，引物位置，PCR产物的二级结构等因素，建议采用专业的引物设计软件进行设计。
5. 本试剂盒推荐使用特异性探针，建议采用专业的设计软件进行设计。

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、5×WinScript One Step RT-qPCR U⁺ Buffer、WinScript One Step RT-qPCR U⁺ Enzyme 和 RNase-Free Water溶解并置于冰上备用。
2. 根据以下表格配制反应体系，总体积为25 μL。

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

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

注意：

- 1) 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°C-64°C的范围作为设定参考。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途