



## SuperFast Lyo Probe One Step RT-qPCR U<sup>+</sup> 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 <sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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°C水浴中融化备用。
2. 冻干保护剂长期保存可置于-20°C，如果在短期内需要频繁使用，可在2-8°C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 $\mu$ L 体系	50 $\mu$ L 体系	终浓度
5 $\times$ SuperFast Lyo Probe One Step RT-qPCR U <sup>+</sup> Mix	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L	1 $\times$
2.5 $\times$ 冻干保护剂	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L	1 $\times$
Forward Primer, 10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M <sup>1)</sup>
Reverse Primer, 10 $\mu$ M	0.5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
Probe <sup>2)</sup>	0.25 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	0.1 $\mu$ M
Template RNA <sup>3)</sup>	X $\mu$ L	X $\mu$ L	
RNase-Free Water	Up to 25 $\mu$ L	Up to 50 $\mu$ L	

注意：1) 通常引物终浓度以0.2  $\mu$ M可以得到较好结果，可以在0.1-1.0  $\mu$ M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 <sup>1)</sup>	1
变性	95℃	5 s	} 40-45
退火/延伸	58℃ <sup>2)</sup>	30 s <sup>3)</sup>	

### 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 <sup>1)</sup>	1
变性	95℃	2 s	} 40-45
退火/延伸	58℃ <sup>2)</sup>	15 s <sup>3)</sup>	

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T<sub>m</sub>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
升华干燥	4	-10℃	——	2h	14	时间, 做斜率
	5	0℃	——	1h	14	控制升温
解析干燥	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 $\leq -50^{\circ}\text{C}$

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。