



WinScript Multiplex One Step RT-qPCR U⁺ Kit

目录号：CW3349S

保存条件：-30 ~ -15℃保存，有效期 1 年。如需频繁使用，可分装保存或存放于 2-8℃，尽量避免反复冻融。

产品内容

Component	100 rxns
4×WinScript Multiplex One Step RT- qPCR U ⁺ Buffer	500 μL
WinScript One Step U ⁺ Enzyme	200 μL
RNase-Free Water	2×1 mL

产品简介

本产品是采用探针法（TaqMan, Molecular Beacon等）进行一步法RT-qPCR的专用试剂盒。使用本产品进行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。本试剂盒引入了dUTP-UNG防污染系统，可有效去除PCR产物的残留污染，大大降低了由于扩增产物污染而导致的假阳性。UNG酶在室温下即可将含U的污染物迅速降解，不会影响新的含dU碱基PCR产物的形成。

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-qPCR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。
3. 本试剂盒中的试剂应避免反复冻融；本产品长期保存可置于-20°C，如果在短期内需要频繁使用，可在 2-8°C保存。
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。（反应液的配置请在冰上进行）

1. 将RNA模板、引物、4×WinScript Multiplex One Step RT-qPCR U⁺ Buffer、WinScript One Step U⁺ Enzyme 和 RNase-Free Water溶解并置于冰上备用。
2. RT-qPCR 反应体系：

试剂	20 μL体系	终浓度
4×WinScript Multiplex One Step RT-qPCR U ⁺ Buffer	5 μL	1×
WinScript One Step U ⁺ Enzyme	2 μL	1×
Forward Primer	X μL	0.2 μM ¹⁾
Reverse Primer	X μL	0.2 μM ¹⁾
Probe	X μL	0.1 μM ²⁾
RNA Template	X μL	10pg-100 ng ³⁾
RNase-Free Water	Up to 20 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	循环数
逆转录	55°C	5min ⁴⁾	1
预变性	96°C	20 sec ⁵⁾	1
变性	96°C	5 sec	} 40-45
退火/延伸/荧光采集	58°C ⁶⁾	30 sec ⁷⁾	

注意：4) 逆转录时间可在 1min 至 5min 时间范围内设定。

5) 本产品所采用的热启动酶须在预变性 96°C至少 20sec 下实现酶的活化。

6) 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。

7) 不同的 qPCR 检测仪器所需的荧光信号采集时间不同，请根据最短时间限制进行设置。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途