



WinScript Lyo AD One Step RT-qPCR U⁺ Kit

目录号：CW3354S (1 mL)

CW3354M (5 mL)

保存条件： -30 ~ -15℃ 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℃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℃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℃	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℃	10 min	30 min	--	常温最快速
预冻	2	-45℃	90 min	180 min	--	可根据包材调整保持时间
升华干燥	3	-30℃	90 min	180 min	14	可设置斜率时间， 做斜率控制升温
	4	-10℃	120 min	120 min	14	
	5	0℃	60 min	90 min	14	
解析干燥	6	30℃	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≤-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。

4. 出仓环境温湿度应作控制，建议出仓温度在15~25℃，湿度建议≤30%。