

AccuProbe[®] U One Step qRT-PCR Probe kit

货号：A701

保存：-20℃避光保存两年

货号	规格
A701-01	100 rxns (20 µl/rxn)
A701-02	500 rxns (20 µl/rxn)

【产品概述】

本产品专为以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反应在同一管内完成，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。本产品使用UDG酶和dUTP有效防止PCR产物的交叉污染，数据更准确。热敏感（Heat-labile）UDG在室温下即可将含U的污染物迅速降解，55℃进行逆转反应时，Heat-labile UDG迅速失活，不会影响RT-qPCR的效率和灵敏度。整合ExonScript Reverse Transcriptase以及热启动的DNA聚合酶，配合经过优化的缓冲体系，AccuProbe U One Step qRT-PCR Probe kit的检测灵敏度可达到0.1 pg总RNA或<10拷贝的RNA模板。试剂盒以便捷的SuperMix形式提供，包含优化的缓冲体系和dNTP/dUTP Mix，适用于TaqMan等荧光标记探针的高特异性检测系统。

- 使用2×AccuProbe U One Step SuperMix、AccuProbe U Enzyme Mix高效地将RNA合成第一链cDNA，进行qPCR检测。操作简便、降低操作过程中的污染几率
- 使用dUTP和Heat-labile UDG酶，可有效排除先前扩增产物的交叉污染，数据更准确
- 针对One Step qRT-PCR优化的反应缓冲液，增强特异性，提高扩增效率，重复性好，可信度高

【适用范围】

- 高拷贝、低拷贝基因检测
- 高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板检测
- RNA病毒、微量RNA检测

【产品组成】

Component	A701-01 (100 rxn/20 µl reaction)	A701-02 (500 rxn/20 µl reaction)
2×AccuProbe U One Step SuperMixa	1 ml	4×1.25 ml
AccuProbe U Enzyme Mixb	100 µl	500 µl
50×ROX Reference Dye Ic	40 µl	200 µl
50×ROX Reference Dye IIc	40 µl	200 µl
RNase-free Water	1 ml	4×1.25 ml

- a. 包含dNTPs/dUTP Mix, Mg^{2+} 等。
- b. 包含热启动酶、ExonScript Reverse Transcriptase、Heat-labile UDG以及RNase inhibitor。
- c. 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。不同机型ROX Reference Dye使用情况参见下表：

无需添加 ROX Reference Dye	Bio-Rad iCycler CFX96, CFX384, iQ, iQ5, MyiQ, Opticon, Opticon 2, MiniOpticon, Chromo4; Qiagen Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000; Eppendorf Mastercycler ep realplex, realplex 2 s; Roche Applied Science LightCycler 480; Thermo Scientific PikoReal Cycler; Cepheid SmartCycler; Illumina Eco qPCR; Takara TP-800.
添加ROX Reference Dye I (终浓度为1×)	Applied Biosystems 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne, StepOnePlus.
添加ROX Reference Dye II (终浓度为1×)	Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA7, QuantStudio 3, QuantStudio 5, QuantStudio 6, Stratagene MX3000P, MX3005P, Mx4000.

【推荐One Step qRT-PCR体系（以20 µl反应体系为例）】

Component	Volume
RNase-free Water	Up to 20 µl
2×AccuProbe U One Step SuperMix	10 µl
AccuProbe U Enzyme Mix	1 µl
10 µM Forward Gene Specific Primer	0.4 µl
10 µM Reverse Gene Specific Primer	0.4 µl
10 µM Probe	0.4 µl
ROX Reference Dye (50×) (optional)	0.4 µl
Template	Total RNA: 1 pg - 1 µg

反应体系中各成分的量可根据以下原则进行调整：

- 反应体系中引物终浓度为 $0.2\ \mu\text{M}$ 即可得到较好的扩增效果。当反应性能较差时，可以在终浓度 $0.1 - 0.5\ \mu\text{M}$ 范围内进行调整
- 使用的探针浓度，根据使用的Real Time PCR扩增仪及探针的荧光标记物不同而不同，请参照仪器说明书及探针附带的说明书调整探针使用量。通常探针终浓度在 $0.1 - 0.5\ \mu\text{M}$ 范围内进行调整
- qPCR灵敏度极高，建立反应体系时，加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后（如稀释至 $2 - 5\ \mu\text{l}$ /样本）加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性
- 扩增产物长度请选择在 $80 - 200\ \text{bp}$ 范围内

【PCR条件】

Step	Temperature	Duration	Cycles
Reverse Transcription	$55^{\circ}\text{C}^{\text{a}}$	10 min	1
Enzyme activation	94°C	10 min	1
Initial denaturation	95°C	3 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	40 -45
Annealing/Extension ^b	60°C	30 sec	

a. 对于具有复杂二级结构或高GC区域的模板，使用 55°C 进行逆转录反应，有助于提高扩增效率和灵敏度。

b. 退火/延伸时间请根据您使用的Real-time PCR仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用ABI 7700和7900时至少30秒；使用ABI 7000和7300时至少31秒；使用ABI 7500时至少34秒。

【注意事项】

- 避免RNase污染
- 为保证逆转录成功，请适用高质量的RNA模板
- 本试剂盒只适用于以基因特异性引物扩增目的基因，不能适用Oligo(dT)或Random Primer合成cDNA
- AccuProbe U Enzyme Mix含有高浓度的甘油，使用前请短暂离心，收集到反应管底部后准确吸取
- 反应液的配制请适用RNase-free枪头，EP管等，尽量避免污染



■ 蓉为基因/Exongen Biotech Co., Ltd
 ■ 咨询热线/400-0800-717
 ■ 技术支持/support@exongen.com

■ 网址/www.exongen.com
 ■ 销售/sales@exongen.com
 ■ 售后/service@exongen.com