

产品概述

4×Neoscript Probe qRT Premix (Universal ROX)是 RT-PCR 荧光定量探针法定性、定量反应的专用试剂。本品含有去除 RNase H 活性的高温反转录酶 Neoscript RTase 和新型热启动酶, 具有更高的反转录和 PCR 扩增效率, 适合于低浓度 RNA 模板的高灵敏度扩增。本试剂搭配 4×gDNA Wiper, 采用优化配方的 qPCR 专用 Buffer, 可彻底去除 RNA 模板中残留的基因组 DNA 污染对 qPCR 的影响, 大大提高了 qPCR 反应的扩增效率和检测灵敏度, 可以在较宽的定量区域内得到良好的标准曲线, 准确进行定量。本试剂与多数厂家的荧光定量 PCR 仪兼容, 如 Applied Biosystems、Eppendorf、Bio-Rad 和 Roche 等。

试剂组成

组分	BR1F201-01 100 T (20 µL/T)	BR1F201-02 500 T (20 µL/T)
4×Neoscript Probe qRT Premix (Universal ROX)*	0.5 mL	2×1mL+0.5 mL
4×gDNA Wiper Mix	0.5 mL	2×1mL+0.5 mL

*包含 Reverse Transcriptase、Taq DNA Polymerase、dNTPs、Mg²⁺、Universal ROX Reference Dye。

保存条件

-20±5°C避光存储。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途, 不用于临床诊断。
2. 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。
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, 如每次使用量较少, 推荐小份分装使用。
4. 该体系常用 50°C 进行反转录反应, 可以在 42°C-55°C 范围内进行反转录温度优化; 根据反应特征不同, 可以在 5-30 min 内对反转录时间进行优化。
5. 该体系所用的 Neoscript RTase 是在 M-MLV 基础上进行了基因改造, 具有更高的温度耐受性和反转录温度, 对 RNA 复杂结构模板具有更高的反转录效率。
6. 该体系具有良好的体系稳定性和适用性, 非常适用于病毒类、组织提取 RNA 复杂模板的检测; 对极低浓度模板的扩增效果更加稳定, 适用于高灵敏度分子诊断试剂使用。
7. 对于退火温度较低的引物或超过 200 bp 长片段扩增建议采用三步法。
8. 扩增前后请使用专用的区域和移液器, 戴手套操作并经常更换; PCR 反应完成后切勿打开反应管, 以最大限度地减少 PCR 产物对样品的污染。

qRT-PCR 反应体系配制

1. RNA 模板中基因组 DNA 去除(可选)

试剂	加量
4×gDNA Wiper Mix	5 µL
Template RNA	10 pg-1 µg*
RNase-free ddH ₂ O	To 20 µL

*不同种类的 RNA 模板中含有的靶基因的拷贝数不同, 必要时可进行梯度稀释, 确定最佳的 RNA 模板添加量。

2. 使用移液器吹打混匀后, 42°C 加热 2 min, 85°C 5s。(可使用 PCR 仪控温)。

3. 取一支新的无酶 Ep 管，加入以下组分，至总体积为 20 μL（在冰上进行配制），轻轻混匀。

试剂	加量
4×Neoscript Probe qRT Premix (Universal ROX)	5 μL
20×Primer Probe Mix	1 μL*
Template RNA	10 pg-1 μg
RNase-free ddH ₂ O	To 20 μL

*使用普通 PCR 程序扩增时，通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果；反应性能较差时，可以在 0.2-1 μM 范围内调整引物浓度。通常探针浓度在 0.1-0.3 μM 范围内优化。可进行浓度梯度的实验，寻找引物和探针的最佳组合。

反应条件

步骤	温度	时长	循环数
逆转录	50℃	10 min	1
预变性 ¹	95℃	1 min	1
变性	95℃	10 s	40
*退火延伸 ²	56-64℃	30 s	
*熔解曲线分析 ³			

1. 预变性条件适合绝大多数扩增反应，如模板结构复杂，可将预变性时间延长至 3 分钟以提高预变性效果。
2. 超过 200 bp 时，推荐延伸时间适当延长，退火延伸的温度根据设计的引物 T_m 值进行调整。
3. 熔解曲线分析请以所使用的荧光定量 PCR 仪推荐的程序进行设定。
4. *标注处设置信号采集。