

产品概述

Neoscript RT Premix Multi-UNG (Probe qRT-PCR) 是适用于多重扩增的, 一步法 (One Step) RT-PCR 荧光定量探针法定性、定量反应的专用试剂; 反应过程在同一管内连续进行, 避免开管, 能有效防止污染。本品含有去除 RNase H 活性的高温反转录酶 Neoscript RTase 和经基因工程改造而来的热启动 Taq 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。本试剂采用优化配方的 qPCR 专用 Buffer 和 UNG/dUTP 防污染系统, 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, 并能够有效防止 PCR 产物残留、气溶胶污染导致的假阳性扩增。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

- 20×Neoscript RTase/UNG Multi Mix
- 8×Neoscript RT Premix Multi Buffer (dUTP) (Mg^{2+} free) (DG)
- 360 mM $MgCl_2$

保存条件

-20°C 长期保存, 4°C 可保存 3 个月。使用前应混匀, 避免反复冻融。

qRT-PCR 反应体系配制

试 剂	25 μ L 体系	50 μ L 体系	终浓度
8×Neoscript RT Premix Multi Buffer (dUTP) (Mg^{2+} free) (DG)	3.125 μ L	6.25 μ L	1×
20×Neoscript RTase/UNG Multi Mix	1.25 μ L	2.5 μ L	1×
360 mM $MgCl_2$	0.417 μ L	0.833 μ L	6 mM
25×Primer-Probe Mix ¹	1 μ L	2 μ L	1×
Template RNA ²	—	—	—
ddH ₂ O	To 25 μ L	To 50 μ L	—

- 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果; 反应性能较差时, 可以在 0.2~1 μ M 范围内调整引物浓度。通常探针浓度在 0.1~0.3 μ M 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。
- 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。

反应条件

步骤	温度	时长	循环数
逆转录	50°C	10~20 min	1
变性	95°C	1~5 min	1
变性	95°C	10~20 s	40~50
退火延伸	56~64°C	20~60 s	

*本品所含温敏型 TS-UNG 酶在室温下即可发挥功能, 在逆转录过程失活。

质量控制

- 功能检测: qRT-PCR 的敏感性、特异性、可重复性。
- 无外源核酸酶活性, 无外源内切、外切核酸酶污染。

货号: M8254

8×Neoscript RT Premix Multi-UNG
(Probe qRT-PCR)

2024V01



技术说明

1. 该体系含 TS-UNG 酶，能够在室温或 25°C 条件下降解含尿嘧啶的 DNA 模板，并在逆转录过程被灭活，从而不影响后续以 cDNA 为模板的 PCR 扩增。
2. 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。
3. 该体系所用的 Neoscript RTase 是在 M-MLV 基础上进行了基因改造，使其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。
4. 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，适合于高灵敏度分子诊断试剂使用。
5. 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。
6. 不同待扩增基因对 dUTP 的利用效率和对 UNG 酶的敏感度不同，因此，如果采用 UNG 体系导致检测灵敏度下降，应对反应体系进行调整优化，如需技术支持请与我公司联系。
7. 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。