

产品概述

FastAmpli RT Premix-UNG (Probe qRT-PCR) 是荧光定量 (TaqMan 探针法) RNA 扩增检测的专用试剂, 含有经基因改造筛选得来的快速扩增的逆转录酶及 DNA 聚合酶, 能在 20~40 min 内完成 PCR 反应。本品具有较强的抑制物耐受性, 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, 在较宽的定量区域内均能得到良好的标准曲线, 准确进行定量。本试剂采用抗抑制扩增酶与 UNG 酶的混合酶, 以及含有 dUTP 的优化 Buffer 体系, 不但能够实现含抑制物样品中目的基因的良好扩增, 而且可以有效防止 PCR 产物残留、气溶胶污染所带来的假阳性反应。本品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

1. 10×FastAmpli RTase/UNG Mix
2. 5×FastAmpli RT Premix Buffer (dUTP) (Mg^{2+} free) (DG)
3. 25×MgCl₂

保存条件

-20℃长期保存, 4℃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 μL 体系	50 μL 体系	终浓度
5×FastAmpli RT Premix Buffer (dUTP) (Mg^{2+} free) (DG)	5 μL	10 μL	1×
10×FastAmpli RTase/UNG Mix	2.5 μL	5 μL	1×
25×MgCl ₂	1 μL	2 μL	1×
25×Primer-Probe Mix ^{1,2}	1 μL	2 μL	1×
Template RNA ³	—	—	—
ddH ₂ O	To 25 μL	To 50 μL	—

1. 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。
2. 使用快速 PCR 程序扩增时, 适当提高引物探针浓度有可能获得更好的扩增结果, 引物探针比例应进行配比优化。
3. 不同种类的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, 确定最佳的模板添加量。

反应条件

普通 PCR 程序				快速 PCR 程序			
步骤	温度	时长	循环数	步骤	温度	时长	循环数
逆转录	50℃	10~20 min	1	逆转录	50℃	5 min	1
变性	95℃	1~5 min	1	变性	95℃	30 s	1
变性	95℃	10~20 s	40~50	变性	95℃	1~3 s	40~45
退火延伸	56~64℃	20~60 s		退火延伸	56~64℃	3~20 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

货号：M5144

5×FastAmpli RT Premix-UNG (Probe qRT-PCR)

2024V01



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

技术说明

1. 本品所含快速 DNA 聚合酶的扩增速率不低于 1 kb/10 s。不同快速 PCR 仪其升降温速、控温模式、导热效率差异较大，建议结合具体快速 PCR 仪，进行其最适反应条件的优化。
2. 逆转录时间根据待扩增片段的长度进行优化，较长片段可适当延长逆转录时间。
3. 退火延伸温度应根据引物探针的 T_m 值和反应的实际情况进行优化。
4. 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。
5. 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。
6. 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。