

PerfectStart® Uni RT&qPCR Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: AUQ-01

版本号: Version 3.0

保存: -20℃避光保存两年。

产品说明

PerfectStart® Uni RT&qPCR Kit是具有高效合成效率和高扩增效率的两步法荧光定量PCR试剂盒。在同一反应体系中,用5×All-in-One Reaction Mix for qPCR和TransScript® Uni All-in-One Enzyme Mix在42℃-65℃条件下,高效地将RNA合成第一链cDNA,同时去除基因组DNA;另配有20×No RT Control Mix,用于配制无反转录酶的对照,判断qPCR模板是否来自cDNA。qPCR使用PerfectStart® Green qPCR SuperMix扩增。

特点

- 用5×All-in-One Reaction Mix for qPCR和TransScript® Uni All-in-One Enzyme Mix 高效地将RNA合成第一链cDNA,反转录仅需5分钟。同时去除基因组DNA。操作简便,降低操作过程中的污染机率。
- 用PerfectStart® Green qPCR SuperMix扩增,扩增效率高,特异性高,灵敏度好,数据准确。
- 配有适用于不同机型的Universal Passive Reference Dye (调整PCR加样误差引起的管间差异),数据准确。

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。

产品组成

Component	AUQ-01
5×All-in-One Reaction Mix for qPCR	400 μl
TransScript® Uni All-in-One Enzyme Mix	100 μl
20×No RT Control Mix	40 μl
2×PerfectStart® Green qPCR SuperMix	15×1 ml
Universal Passive Reference Dye (50×)	600 μl
RNase-free Water	2×1 ml
Nuclease-free Water	3×5 ml

第一链cDNA合成和gDNA去除

1、反转录反应体系与 No RT Control 反应体系 (可选)

Component	Volume (RT Reaction)	Volume (No RT Control)
Total RNA/mRNA	≤1 μg/ ≤100 ng	≤1 μg/ ≤100 ng
5×All-in-One Reaction Mix for qPCR	4 μl	4 μl
TransScript® Uni All-in-One Enzyme Mix	1 μl	-
20×No RT Control Mix	-	1 μl
RNase-free Water	Variable	Variable
Total volume	20 μl	20 μl

2、轻轻混匀,50℃孵育5分钟。

对于高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板,可适当升高反应温度(≤65℃)。

3、85℃加热2分钟失活。



推荐qPCR体系与条件 (以20 μl 反应体系为例)

Component	Volume	Final Concentration
Template	Variable	as required
Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
2×PerfectStart® Green qPCR SuperMix	10 μl	1×
Universal Passive Reference Dye (50×) (optional)	0.4 μl	1×
Nuclease-free Water	Variable	-
Total volume	20 μl	-

qPCR (三步法)

94°C 30 sec
 94°C 5 sec
 50-60°C 15 sec ★
 72°C 10 sec ★

40-45 cycles

Dissociation Stage

qPCR (两步法)

94°C 30 sec
 94°C 5 sec
 60°C 30 sec ★

40-45 cycles

Dissociation Stage

对于ABI仪器，荧光信号采集步骤（三步法中可以是退火或是延伸步骤）的时间如下

- ★使用ABI Prism7700/7900时，采集时间设定为30秒；
- ★使用ABI Prism7000/7300时，采集时间设定为31秒；
- ★使用ABI Prism7500时，采集时间设定为34秒；
- ★使用ABI ViiA 7时，采集时间设定为至少19秒。

高扩增效率选择三步法。高特异性选择两步法。

Universal Passive Reference Dye适用机型

- Universal Passive Reference Dye

ABI Prism 7000/7300/7700/7900, ABI Step One, ABI Step One Plus, ABI 7900HT, ABI 7900HT Fast; ABI Prism 7500, ABI Prism 7500 Fast, ABI QuantStudio Dx/3/5, ABI QuantStudio 6/7/12K Flex, ABI ViiA 7, Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000

- No Passive Reference Dye

Roche LightCycler 480, Roche Light Cycler 96, MJ Research Chromo4, MJ Research Opticon 2, Takara TP-800, Bio-Rad iCycler iQ, Bio-Rad iCycler iQ5, Bio-Rad CFX96, Bio-Rad C1000 Thermal Cycler, Thermo Scientific Pikoreal 96, Qiagen Corbett Rotor-Gene 6000, Qiagen Corbett Rotor-Gene G, Qiagen Corbett Rotor-Gene Q, Qiagen Corbett Rotor-Gene 3000, Mastercycler ep realplex

注意事项

- 对于复杂RNA模板，或为了获得更高的合成效率，建议将RNA模板与RNase-free Water混匀，65°C孵育5分钟后，冰浴2分钟，然后再加入其它反应组分。
- 避免RNase污染。
- 为保证反转录成功，请使用高质量的RNA模板。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V3.0-202402

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

