



M-MLV One-Step RT-qPCR(Probe) Kit

【试剂盒组成】

组分	MT701-01 (20 µl×100 rxns)
2 × One-Step RT-qPCR Buffer	1 ml
Taq HS(5U/µl)	40 µl
RT Enzyme Mix	40 µl
H ₂ O(RNase free)	1 ml

【贮藏及有效期】 试剂盒-20℃以下冷冻避光保存，有效期为 12 个月。

【产品简介】

采用了探针法 (TaqMan) 一步RT-qPCR 方案。反转录与qPCR 反应在同一反应体系中连续进行，反应中不需添加任何试剂，操作简单，并能有效防止污染。RT Enzyme Mix 含有反转录酶与RNA酶抑制剂，Taq HS(5U/µl)为抗体修饰的Taq酶，具有热启动，检测精确度更高，灵敏度更高的特点。本制品可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对多种丰度的靶基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。

【产品特点】

1. RT Enzyme Mix 含有反转录酶与RNA酶抑制剂，可对微量RNA进行反转录。
2. qPCR使用了Taq HS(5U/µl)，可以进行热启动法PCR反应，与产品Buffer系统结合，具有扩增效率高，灵敏度高的特点。
3. 只能使用特异引物，不能使用Oligo(dT)和Random Primer。

【使用方法】

配制反应体系

成分	体积	终浓度
2× One-Step RT-qPCR Buffer	10 µl	1×
Taq HS(5U/µl)	0.4 µl	
RT Enzyme Mix	0.4 µl	
PCR Forward Primer (10 µM)	0.4 µl	0.2 µM ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 µM)	0.4 µl	0.2 µM ^{*1}
Probe	0.4 µl ^{*2}	
RNA模板	2 µl ^{*3}	
H ₂ O(RNase free)	To 20 µl	

*1 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 0.1~1.0 µM 范围内调整引物浓度。

*2 探针浓度与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关，实际使用时请参照仪器说明书，或各荧光探针的具体使用要求进行。

*3 模板使用量依据具体实验而定，建议RNA使用量在10 pg- 100 ng。

扩增程序

操作方法*1

反转录反应

42°C 5 min^{*2}

95°C 30 sec

PCR 反应

95°C 10 sec

60°C 30 sec } 40 -45 Cycles

*1 如果所用仪器有特殊使用程序，请参照仪器说明书进行。

*2 反转录温度与时间可根据模板的具体情况进行调整。一般反转录温度可在 42-60℃之间调整；反转录时间可在 5-30 min 之间调整。

【注意事项】

- (1) 所有试剂应在规定温度储存。-20℃保存的试剂在使用前应充分混匀。试剂盒避免反复冻融。
- (2) 实验操作应按照国家有关临床基因扩增实验室管理规范执行，实验过程应分区(试剂准备区、样本制备区、核酸扩增区)，各区物品为专用，不得交叉使用，避免污染。
- (3) 操作台、移液器、离心机等仪器用品应经常用1%次氯酸钠、75%乙醇或紫外灯进行消毒。耗材应进行无酶处理。
- (4) 待检样本、试剂盒组份及实验中的废弃物需按照具有潜在传染性物质处理方法进行处理。
- (5) 为防止荧光干扰，应避免使用含荧光物质的手套，避免用手直接接触，预防交叉污染。
- (6) 检测结果为阴性，并不完全代表为非感染状态，具体诊断需结合兽医临床。
- (7) 产生假阴性的可能原因为：待检样本在采集、运输、保存及核酸提取过程中操作不当造成DNA降解；样本中核酸浓度低于最低检测限；病毒待测靶基因出现变异；未经验证的其他干扰因素。
- (8) 产生假阳性的可能原因为：待检样本采集、运输及核酸提取过程中发生交叉污染。

BM20220729