货号：M2274-090803

2×Neoscript RT Premix OT-UNG (Probe qRT-PCR) (090803) V01

产品概述

Neoscript RT Premix OT-UNG (Probe qRT-PCR) (090803)是一步法（One Step）RT-PCR 荧光定量探针法定性、定量反应的专用试剂。本产品采用定向改造的高亲和力抗体修饰 DNA 扩增酶、温启动逆转录酶，经过 Buffer 的深度优化，实现了酶、buffer 和引物探针全预混、低温长期存储稳定的效果，提高了终端产品使用便捷性。试剂中引入了 dUTP/UNG 防污染系统，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，保证结果的准确性。

试剂组成

1. 25×Neoscript RTase/UNG OT Mix (090802)
2. 2×Neoscript RT Premix OT Buffer (dUTP) (090801)

保存条件

-20±5℃存储；使用前应混匀，避免反复冻融。

本品冷藏后如若出现沉淀，属于正常现象；建议平衡至室温后再混匀使用。

qRT-PCR 反应体系配制

试剂	25 μL 体系	50 μL 体系	终浓度
2×Neoscript RT Premix OT Buffer (dUTP) (090801)	12.5 μL	25 μL	1×
25×Neoscript RTase/UNG OT Mix (090802)	1 μL	2 μL	1×
25×Primer-Probe Mix[1]	1 μL	2 μL	1×
Template RNA[2]	——	——	——
ddH_2O	To 25 μL	To 50 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 0.2-1 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. 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℃	5-10 min	1
变性	95℃	30s-1 min	1
变性	95℃	10-20 s	40-50
退火延伸	56-64℃	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

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. 该体系常用 50℃进行反转录反应，可以在 42℃-55℃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。
2. 该体系所用的**新型逆转录酶**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。
3. 该体系具有良好的体系稳定性和适用性，非常适合于病毒类、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。
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。