货号：MD5104-019401-DB

5×SensiDirect RT Premix-UNG (Probe qRT-PCR) (019401) V01

产品概述

SensiDirect RT Premix-UNG (Probe qRT-PCR) (019401)是专用于免除样品的核酸提取纯化步骤，直接进行一步法（One Step）RT-PCR 靶基因荧光定量（探针法）检测的专用试剂。本品具有很强的抑制物耐受性，无需进行核酸提取纯化即可用于抗凝全血、血浆、血清、咽拭子、唾液等样品的一步法 RT-PCR 直接扩增检测。本试剂采用 TS-UNG 酶和含有 dUTP 的优化 Buffer 体系，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。

试剂组成

1. 12.5×SensiDirect RTase/UNG Mix (with dNTPs) (019401)
2. 5×SensiDirect RT Buffer (014403)

保存条件

-20±5℃存储；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×SensiDirect RT Buffer (014403)	5 μL	10 μL	1×
12.5×SensiDirect RTase/UNG Mix (with dNTPs) (019401)	2 μL	4 μL	1×
25×Primer-Probe Mix[1]	1 μL	2 μL	1×
Sample[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. 不同类型的生物样本中所含抑制物的种类、含量及靶基因的拷贝数均不同；不同类型的样本保存液（如拭子保存液）对于扩增反应的影响也存在差异。因此应根据样本类型和检测灵敏度要求等实际情况确定反应体系中的最佳加样量，必要时可以先对样品采用无核酸酶水或 TE Buffer 稀释后再加样。建议加样量如下：

样品类型	50 μL 反应体系加量	最大加样比例
抗凝全血	2.5 μL	5%
血浆	15 μL	30%
血清	15 μL	30%
咽拭子	10 μL	20%
唾液	10 μL	20%

反应条件

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

快速 PCR 程序			
步骤	温度	时长	循环数
逆转录	50℃	5 min	1
变性	95℃	30 s	1
变性	95℃	1-3 s	40-45
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

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；适合进行多重荧光定量探针法 RT-PCR 反应。
2. 如出现荧光值过低或扩增抑制现象明显等问题，建议减少加样量或对样品稀释后再加样；也可在保持加样量不变的情况下，通过增大反应体积（60-100 μL）进行改善。
3. 上述血液、唾液、咽拭子等样品的采集均按照临床标准操作要求进行；为避免核酸降解，可使用新鲜采集的样品。
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。