货号：FMD5104-000814-TP

5×SensiDirect RT Premix-UNG (Probe qRT-PCR) (DG) (000814)

2026V01

产品概述

SensiDirect RT Premix-UNG (Probe qRT-PCR) (DG) (000814) 是专为冻干工艺开发的，用于免除样品的核酸提取纯化步骤，直接进行靶基因荧光定量（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、唾液、咽拭子等样品的 RNA 直接扩增检测。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。本试剂冻干后具有良好的冻干形态及产品稳定性。

试剂组成

1. 20×SensiDirect Enzyme/UNG Mix (with dNTPs) (DG) (000814)
2. 200×SensiDirect RTase (DG) (000814)
3. 5×SensiDirect RT Buffer (DG) (000814)
4. 2×冻干保护剂（选配）

保存条件

-20±5℃存储；使用前应混匀，避免反复冻融。

反应条件

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

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

*本品所含温敏型 TS-UNG (DG)酶在室温下即可发挥功能，在逆转录过程失活。

qRT-PCR 液体反应体系配制

试剂	25 μL 体系	50 μL 体系	终浓度
5×SensiDirect RT Buffer (DG) (000814)	5 μL	10 μL	1×
20×SensiDirect Enzyme/UNG Mix (with dNTPs) (DG) (000814)	1.25 μL	2.5 μL	1×
200×SensiDirect RTase (DG) (000814)	0.125 μL	0.25 μL	1×
2×冻干保护剂 [1]	12.5 μL	25 μL	1×
25×Primer-Probe Mix [2,3]	1 μL	2 μL	1×
Sample [4]	——	——	——
ddH_2O	To 25 μL	To 50 μL	——

1. 此体系为可冻干体系，当客户使用此体系无冻干需求时，2×冻干保护剂可以选择性加入；如若有冻干产品需要，在液体试剂阶段进行产品性能验证时，必需加入 2×冻干保护剂，以保证与冻干后体系组分及效果一致。
2. 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。
3. 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。
4. 不同类型的生物样品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%
咽拭子	10 μL	20%
唾液	10 μL	20%

体系用于冻干时，冻干体系配制

试剂	25 μL 体系
5×SensiDirect RT Buffer (DG) (000814)	5 μL
20×SensiDirect Enzyme/UNG Mix (with dNTPs) (DG) (000814)	1.25 μL
200×SensiDirect RTase (DG) (000814)	0.125 μL
2×冻干保护剂	12.5 μL
25×Primer-Probe Mix	1 μL
ddH_2O	To 20~25 μL

*如需其他体系冻干配制，请另询。

冻干条件

步骤	温度	时长	状态	压强
预冻	4°C	30 min	Hold	1 atm
	-50°C	60 min	降温	
	-50°C	180 min	Hold	
一次升华	-30°C	60 min	升温	极限真空
	-30°C	720 min	Hold	
二次升华	25°C	60 min	升温	极限真空
	25°C	300 min	Hold	

1. 此冻干工艺为 **25 μL 体系**原位冻干工艺，如需进行冻干珠的冻干或其他体系原位冻干，请另询。
2. 以上冻干工艺仅作参考。产品类型不同、使用不同的冻干机，冻干参数有差异，使用过程中可根据实际对工艺进行调整。
3. 不同的冻干工艺有可能适用于不同的冻干批量，用于大批量生产时务必进行充分的测试验证。

冻干粉使用方法

1. 将冻干粉进行瞬时离心；
2. 向冻干粉中加入模板，并加适量水补足至 25 μL；
3. 混匀离心，上机。

*推荐使用宝泰仪公司混匀离心一体机 CM-8 或 CM-8 Plus 进行标准化的离心混匀操作。

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. 本品所含 DNA 聚合酶的扩增速率不低于 1 kb/10 s。不同 PCR 仪其升降温速率，控温模式及导热效率差异较大，建议结合具体快速 PCR 仪，进行其最适反应条件的优化。
2. 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。
3. 上述血液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，建议使用新鲜采集的样品。
4. 对于退火温度较低的引物或超过 200bp 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。