



# WinScript Universal One Step RT-qPCR Kit

**目录号：** CW3362S (200 rxns)

CW3362M (1000 rxns)

**保存条件：** -30 ~ -15°C保存，尽量避免反复冻融。

## 产品内容

Component	CW3362S 200 rxns	CW3362M 1000 rxns
5×WinScript Universal One Step RT-qPCR Buffer	1 mL	5 mL
WinScript Universal One Step Enzyme	200 µL	1 mL

## 产品简介

WinScript Universal One Step RT-qPCR Kit是以 RNA 为模板进行单重或多重定量 PCR 反应的试剂盒。使用本产品进行Real-Time RT-qPCR反应时，逆转录和定量PCR在同一反应体系中进行，反应过程中无需添加试剂，无需打开管盖，避免了污染的同时提高了实验效率。

本试剂盒主要包含优化的Buffer和Enzyme等，缓冲液中含有Mg<sup>2+</sup>和dNTP等，并添加了有效抑制非特异性PCR扩增的因子和提升qPCR反应扩增效率的因子，能够在保证引物扩增效率的同时，进行荧光定量扩增反应。该产品可以兼容常规及快速检测。

## 注意事项

1. 本试剂盒中试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
2. 本产品以RNA为模板进行一步法RT-PCR实验，在操作过程中应避免RNase污染，建议在专门的区域进行RNA操作，使用专门的仪器和耗材，操作人员带口罩和一次性手套并经常更换手套，实验相关耗材应用0.1%DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在37°C处理12小时,并高压灭菌30分钟后使用。
3. 本试剂盒中的各试剂应尽量避免反复冻融，反复冻融可能使产品性能下降，建议分装保存。
4. 本试剂盒必须使用特异性引物，引物的选择可根据具体实验来选择，引物设计的好坏直接影响到RT-qPCR反应的结果，设计引物时需考虑GC含量，引物长度，引物位置，PCR产物的二级结构等因素，建议采用专业的引物设计软件进行设计。
5. 本试剂盒推荐使用特异性探针，建议采用专业的设计软件进行设计。

## 使用方法

以下举例为常规的反应体系和反应条件，实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小的不同进行相应的改进和优化。

1. 将RNA模板、引物、5×WinScript Universal One Step RT-qPCR Buffer、WinScript Universal One Step Enzyme溶解并置于冰上备用。
2. 根据以下表格配制反应体系，总体积为25μL。

试剂	25μL反应体系	终浓度
5×WinScript Universal One Step RT-qPCR Buffer	5 μL	1×
WinScript Universal One Step Enzyme	1 μL	1×
Primer/Probe mix <sup>1)</sup>	X μL	
RNA Template <sup>2)</sup>	X μL	
RNase-Free Water	up to 25 μL	

注意：1) 通常引物浓度以0.2  $\mu\text{M}$ 可以得到较好结果，可以在0.1-1.0  $\mu\text{M}$ 作为设定范围的参考。使用的探针浓度，与使用的荧光定量PCR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浓度的调节。

2) 通常RNA模板的量以10 pg-100 ng为参照，因不同物种的模板中含有的目的基因拷贝数不同，可对模板进行梯度稀释，以确定最佳的模板使用量。

3. 混匀，短暂离心，将溶液收集到管底。

#### 4. RT-qPCR反应条件：

常规反应条件：

步骤	温度	时间	循环
逆转录	50°C	5 min	1
预变性	95°C	30 s	1
变性	95°C	10 s	} 45
退火延伸，收集荧光	58°C <sup>1)</sup>	30 s	

快速反应条件：

步骤	温度	时间	循环
逆转录	50°C	5 min	1
预变性	95°C	20 s	1
变性	95°C	2 s	} 45
退火延伸，收集荧光	58°C <sup>1)</sup>	15 s <sup>2)</sup>	

注意：1) 建议采用两步法PCR反应程序，若因使用Tm值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试进行三步法PCR扩增，退火温度请以 56°C-64°C的范围作为设定参考。

2) 快速程序中退火时间可根据使用仪器默认的最短时间设定。