



WinScript Universal One Step RT-qPCR Kit

目录号：CW3362

运输与保存：-20±5℃保存，尽量避免反复冻融。

产品内容

| Component | CW3362S | CW3362M |
|---|---------|---------|
| 5×WinScript Universal One Step RT-qPCR Buffer | 1 mL | 10 mL |
| WinScript Universal One Step Enzyme | 200 μL | 2×1 mL |

产品简介

WinScript Universal One Step RT-qPCR Kit是以 RNA 为模板(如RNA病毒)进行定量 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。

本试剂盒耐热HiFi V M-MLV (H-) Reverse Transcriptase高效合成第一链cDNA，并利用热启动SuperFastStar DNA Polymerase进行定量扩增。本试剂盒主要包含优化的Buffer缓冲液中含有Mg²⁺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，适用于TaqMan等荧光标记探针的高特异性、低模板浓度和单重及多重检测系统。本产品还可兼容快速程序，大大缩短了检测时间。

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，操作人员戴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25 μL 。

| 试剂 | 25 μL 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 ¹⁾ | X μL | |
| RNA Template ²⁾ | X μL | |
| RNase-Free Water | up to 25 μL | |

注意：

- 1) 通常引物浓度以0.2 μM 可以得到较好结果，可以在0.1-1.0 μM 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反应程序：

标准反应程序（可获得最高的扩增灵敏度）：

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环 |
|-----------|--------------------|--------|------|
| 逆转录 | 50°C ¹⁾ | 15 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 ²⁾ | 30 s | |

快速反应程序（可满足大部分应用）：

| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环 |
|-----------|--------------------|-------|------|
| 逆转录 | 50°C ¹⁾ | 5 min | 1 |
| 预变性 | 95°C | 30 s | 1 |
| 变性 | 95°C | 5 s | } 45 |
| 退火延伸，收集荧光 | 58°C ²⁾ | 30 s | |

注意：

- 1) 对于具有复杂二级结构或高GC区域的模板，将逆转录温度提高到55°C，有助于提高扩增效率和灵敏度。
- 2) 扩增反应温度可根据设计的引物T_m值进行调整，请以 56°C-64°C的范围作为设定参考。