

Direct RT-qPCR Kit

产品介绍

Direct RT-qPCR Kit 提供分开包装的 RT-qPCR Buffer 和高效 Enzyme Mixture(Taq、M-MLV、RI)，便于后端试剂盒的开发和体系调整，简单验证即可。

该反应体系使用 Foregene 研制的 Foreasy Reverse Transcriptase 及 Foreasy HS Taq DNA Polymerase，配合独特的反应缓冲液，使得该产品具有强大的抗逆性和兼容性，可以直接使用样本裂解液（Foregene Lysis system）作为模板进行检测反应。可用于新冠核酸测试剂盒，其他类型病原菌核酸测试剂盒开发。

该产品可以直接作为 IVD 产品的组分，使用简单，快捷；只需简单验证即可，无需再次开发。

产品组成

试剂盒组成 (20 μ L 体系)	IM-05111	IM-05112
		500 T
Direct Enzyme Mixture	500 μ L x1	50 mL x1
2x Direct RT-qPCR Buffer	1 mL x5	500 mL x1

注：若需要 ROX Reference Dye 可随试剂盒提供。

保存

-20 \pm 5 $^{\circ}$ C保存 2 年。

产品特点

- ◆ 酶混合液和反应缓冲液分开独立包装，便于后端开发体系优化。

- ◆ 高效优化的酶混合体系配合抗逆性极强的反应体系，可应付各类纯化 RNA 样本或非纯化样本，如直接裂解的拭子样本。
- ◆ 反应体系添加了 Foreasy RNase Inhibitor 可抑制 RNase 活性，保护模板 RNA。
- ◆ 优化的反应体系使得反应具有更高的检测灵敏性，更强的热稳定性，更好的耐受性。

试剂盒组分信息

- ❖ 2x Direct RT-qPCR Buffer: 优化配比的 dNTPs、 Mg^{2+} 、稳定剂、增强剂、优化剂，可直接使用样本裂解产物 (Foregene Lysis system) 作为模板进行 RT-qPCR 反应。
- ❖ Direct Enzyme Mixture: Foreasy Reverse Transcriptase(M-MLV)、Foreasy HS Taq DNA Polymerase、Foreasy RNase Inhibitor 及保护液。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ❖ 试剂应避免反复冻融，否则会导致试剂性能下降或失效。
- ❖ 为避免 RNase 污染，实验操作请在 RNase-Free 空间进行；所用的枪头、PCR tube 都必须保证是 RNase-Free 的；并佩戴一次性手套和口罩。
- ❖ 本试剂盒必须配合特异引物、探针进行实验，请根据实验需要选择需要扩增的基因的特异引物、探针。
- ❖ 使用前，将 2x Direct RT-qPCR Buffer 置于冰上使其完全融化，轻弹混匀后使用；体系的配制请在冰浴上操作，以提高试剂盒性能，提高 PCR 扩增的特异性。

模板 RNA 浓度

- ❖ (1pg-100ng total RNA)/20 μ L 体系。
- ❖ 非纯化模板，如样本释放剂裂解产物，需自行优化模板添加量，推荐搭配 Foregene Lysis system。

操作指南

A: 材料及试剂准备

1. 准备制备好的 RNA 模板(建议使用 Foregene Total RNA Isolation Kit 系列试剂盒提取纯化 RNA)或样本裂解产物(建议使用 Foregene Lysis system)、特异引物(10 μ M)及相关的耗材、仪器。

注意：请确保 RNA 的完整性，尽量使用新鲜样品提取的 RNA。

2. 将 2x Direct RT-qPCR Buffer、RNase-Free ddH₂O、20x ROX Reference Dye(如需要)置于冰上，使其自然融化，并轻弹管壁混匀待用。

B: RT-qPCR 体系配制

使用时只需取反应体系一半体积的反应缓冲液和相应量的酶混合液(如：反应体系为 20 μ L，则取 10 μ L 2x Direct RT-qPCR Buffer，1 μ L 的 Direct Enzyme Mixture)，加入 RNA 模板和特异性引物、探针，并加 RNase-Free ddH₂O 补足体积。具体的 RT-qPCR 反应体系配制可参考下表 1。

表 1: RT-qPCR 体系配制

RT-qPCR 体系添加内容	用 量	终 浓 度
2x Direct RT-qPCR Buffer	10 μ L	1x
Direct Enzyme Mixture	1 μ L	
Forward Primer(10 μ M)	0.8 μ L	50-900 nM
Reverse Primer(10 μ M)	0.8 μ L	50-900 nM
Probe(4 μ M)	1 μ L	200 nM
Template(RNA or Lysate)	X μ L	
20x ROX Reference Dye	-	1*
RNase-Free ddH ₂ O	(6.4-X) μ L	
Total Volume	20 μ L	

注意：Forward Primer 和 Reverse Primer 为目的基因的特异性引物。qPCR 体系可以根据实验需要和 PCR 型号进行调节。大多数引物的终浓度，我们推荐 400 nM。特异引物和 Probe 的用量请根据配制的浓度按照我们推荐的终浓度自行调整用量。其他体积体系的 RT-qPCR，请参照 20 μ L 体系按比例调整试剂用量。

1*: 根据定量 PCR 仪器不同选择合适终浓度的 ROX Reference Dye。常见定量 PCR 仪的最适 ROX Reference Dye 浓度见下表：

定量 PCR 仪	ROX Reference Dye 终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/Step One 等	1× (如 20 μL 体系, 加入 1 μL 20×ROX Reference Dye)
ABI 7500、7500 Fast、Stratagene Mx3000P、Mx3005P 和 Mx4000 等	0.5× (如 20 μL 体系, 加入 0.5 μL 20×ROX Reference Dye)
Roche PCR 仪、Bio-Rad PCR 仪、Eppendorf 定量 PCR 仪等	不用添加 ROX Reference Dye

C: RT-qPCR 反应程序设置

1. 参照上表配制好 RT-qPCR 体系后, 轻轻混匀(可使用枪头轻轻吹打; 也可在涡旋仪上混匀并瞬时离心收集散落在管壁或管盖的液体, 放置于冰盒上待用)。

2. 参照 RT-qPCR 反应程序设置(表 2)设置反应的温度、时间等。

注意: 为了保证 RT-qPCR 反应的活性和提高其扩增效率, 最好在设置好 PCR 仪程序之后再行 RT-qPCR 反应体系的配制, 以便体系配制完成后立即进入反应程序。

3. 为了得到最佳的 PCR 效果, 针对不同的模板、不同的引物可采用梯度 PCR 优化反应条件。

注意: 本试剂盒的提供的 Foreasy HS Taq DNA Polymerase 延伸温度范围为: 60-72°C, 最佳延伸温度为 72°C。

表 2: RT-qPCR 反应程序设置 (例: 两步法)

步骤	温度	时间	循环数	内容
1	50°C	15 min ^{1*}	1	逆转录
2	95°C	1 min	1	预变性
3	95°C	10 sec	30-45	循环中模板变性
	60°C	30 sec ^{2*}		退火/延伸

1*: 逆转录时间可根据实验需要进行调整, 一般的内源基因如 β -Actin, 只需要 10 分钟即可; 检测特异的表达基因, 可以根据需要适当延长逆转录时间。

2*: 根据扩增的 DNA 片段长度设定具体的时间, Foreasy HS Taq DNA Polymerase 的扩增速度为 2 kb/min。

注意: PCR 反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。在具体操作中, 需要根据目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件, 包括退火温度, 延伸时间等。