

工作原理:

TIOSBIO® 探针一步法 RT-qPCR FTL Premix 是一种即用型、单管式的 2× RT-qPCR 预混液，可在单个反应管内同时高灵敏性地完成多达 4 个 RNA / DNA 样本靶标的检测。该预混液包含热稳定的 *MMLV* 逆转录酶、FTL DNA 聚合酶、dNTP 和反应缓冲液。室温条件下，改进的 Buffer 和 FTL DNA 聚合酶具有高稳定性，可高度耐受来源于粗样品的 PCR 抑制剂，尤其适用于病原体检测等应用中检测低丰度 RNA 靶标，可用于一站式自动化高通量测试系统。另外，该预混液可最大程度地避免交叉污染的风险，适用于快速 RT-qPCR，及样品宽动态范围内靶标的检测和准确定量。

预期用途:

RNA 样本靶标的 RT-qPCR 检测，或 DNA 样本靶标的 qPCR 检测。

产品特点:

1. 快速简便、灵敏度高。该试剂盒以探针一步法 RT-qPCR 对低拷贝靶标进行快速、高灵敏性的定量，适用于定量检测低水平表达的 RNA、DNA 病毒或 mRNA。
2. 适用于多重 PCR 反应。FTL DNA 聚合酶反应特异性更高，酶动力更强，特别适用于多重 PCR 反应。可同时高灵敏性地完成多达 4 个 RNA / DNA 样本靶标的检测。
3. 卓越的宽动态范围靶标检测能力，兼容 RNA 和 DNA 样本。该试剂盒经过反复优化，无论是 RNA 或是 DNA 靶标，均表现出高特异性扩增，并在宽动态范围的获得可重复的 Ct 值，操作流程大幅简化，检测效率显著提升。
4. 广泛的仪器兼容性。该试剂盒可以在快速或标准循环模式下运行，在不同定量 PCR 仪上可稳定扩增，表现一致。添加了 50×ROX Reference dye（未提供）后，该试剂盒可用于需要 ROX Reference dye 的定量 PCR 仪。
5. 抗污染能力强。试剂盒以 dUTP 替代 dNTP 中的 dTTP，扩增后的 PCR 产物中包含 dU 碱基。含有气溶胶污染的 dU PCR 产物，可通过添加尿嘧啶-N-糖基化酶（UNG）（未提供）进行降解，从而去除产物气溶胶的假阳性。

试剂盒组成:

名称	50T/100T	数量
2×RT-qPCR FTL Premix*	500 μL	5 管/10 管
说明书	1 份	1 份

*2×RT-qPCR FTL Premix 包含 0.4mM dA / C / GTP、0.8mM dUTP、5mM Mg²⁺、热稳定的 *MMLV* 逆转录酶、FTL DNA 聚合酶、RNase 抑制剂、反应缓冲液和稳定剂等。

包装规格/货号:

包装规格：250 次，货号 JY0501。

储存条件及有效期:

可于 4℃ 条件下保存 2 个月，如需长期保存，应将试剂盒避光保存于 -20℃ 以下。

操作步骤:

1. 引物、探针设计
 - 1) 引物设计

引物长度 18~25bp；引物 Tm 值 60~65℃； GC 含量 40%~60%；扩增目的片段长度 70~200 bp；较大的扩增产物（> 200 bp）通常会降低扩增的效率和特异性。

引物合成级别 PAGE 或 HPLC 级；

2) 探针设计

探针长度 20~30bp；探针 Tm 值 65~70℃； GC 含量 40%~60%；探针引物合成级别 HPLC。

2.引物和探针性能的检测

1) 使用 5 个及其以上的 RNA 模板系列稀释液制备模板梯度稀释物。使用梯度稀释的 RNA 模板和扩增引物及探针进行 RT-qPCR 分析，并绘制标准曲线。

2) 确认 PCR 扩增效率介于 90%~110%之间，并且 $R^2 \geq 0.99$ 。如果 PCR 扩增效率或 R^2 不在上述范围之内，应优化反应条件，直至可以达到上述效果。

3) 如果经反复优化，扩增效果还不能满足试验要求，需要重新设计引物和探针序列。

3. RT-qPCR

1) 使用前完全融化 2×RT-qPCR FTL Premix。轻柔涡旋并短暂离心。

2) 纯化 RNA 的或粗处理样品均可直接或稀释后使用。

3) 按下表配制 RT-qPCR 反应体系。反应液轻柔混合均匀后，瞬时离心，分装至薄壁 qPCR 管或 qPCR 板内。

名称	体积
Tiosbio® 2×RT-qPCR FTL Premix	20μL
上游引物 (10μM)	2μL
下游引物 (10μM)	2μL
TaqMan 探针 (10μM)	0.8μL
50× ROX	0/0.08/0.8μL
模板 RNA 或 DNA 溶液	1~200ng*
UNG	按照相应说明书添加
无核酸酶的 ddH ₂ O	up to 40μL

上述反应液中已经含有终浓度为 2.5mM 的 MgCl₂。当使用粗样品直接进行 RT-qPCR 时，需要在 2.5~8mM 间优化 MgCl₂ 的终浓度。

上述反应液中的 TaqMan 探针浓度为 0.1μM 时，引物终浓度可在 0.2~0.8μM 之间进行优化。如增加扩增引物浓度不能改善试验结果时，可将 TaqMan 探针的浓度增加至 0.4μM。在扩增引物退火温度偏低时，可通过提高引物浓度提高 PCR 效率。若存在引物二聚体，可适当降低引物浓度。如 TaqMan 探针退火温度偏低时，提高 TaqMan 探针的浓度可提高 PCR 的灵敏度，而低浓度的 TaqMan 探针（小于 0.1μM）会因较低的荧光强度而降低 qPCR 灵敏性。

试剂盒未包括 50×ROX。使用 Applied Biosystems 和 Agilent Technologies 等实时 PCR 仪器时，可使用 50×ROX 参考染料平衡荧光强度的管间差，使用体积应按照仪器型号进行调整。如使用 Applied Biosystems 7300/7700 / 7900HT、StepOnePlus 等仪器时，需添加 0.8μL 50×ROX（总反应体积为 40μL）；使用 Applied Biosystems 7500 / 7500Fast、StepOne Plus 或 Agilent Technologies AriaMx 等仪器时，需添加 0.08μL 50×ROX（总反应体积为 40μL）；使用 LightCycler 96 / LightCycler 480 系统（Roche）、CFX96 实时 PCR 检测系统（Bio-Rad）时，无需 ROX 参比染料。

该试剂盒可使用 UNG 避免 PCR 扩增产物的假阳性污染，本试剂盒不提供 UNG，UNG 的添加体积应根据选取的相应制造商说明书进行调整。

4) 循环参数的设定。首先建议使用下述两步法的 RT-qPCR 扩增方案进行反应，并优化 qPCR 的反应条件。

	反应温度	反应时间	循环数
UNG 处理	可选，按照相应说明书添加		-
反转录	52℃	5min	1
预变性	95℃	10sec	1
变性	95℃	10sec	40

退火/延伸	60°C	20sec	
-------	------	-------	--

如引物 T_m 值较低, 或使用两步法 RT-qPCR 扩增方案试验效果不佳时, 可使用三部法的 RT-qPCR 扩增方案进行进一步优化。

注意:

- 应在逆转录步骤之前添加 UNG 处理步骤。反应体系、反应温度和时间均应根据相应试剂盒说明书进行。
- 反转录步骤的反应温度和时间可在 50~60°C, 5~15min 间进行优化。
- 预变性步骤的反应温度和时间可在 95~98°C, 10sec~5min 间进行优化。
- 变性步骤的反应温度和时间可在 95~98°C, 3~10sec 间进行优化。
- 延伸/退火步骤的反应温度和时间可在 60~65°C, 5~20sec 间进行优化。

注意事项及安全提示:

1. 本产品仅供科研使用。使用前请仔细阅读说明书, 严格按照说明书操作。违反或者未按说明书进行操作可能导致错误结果。
2. 产品应依照说明书要求, 储存于合适的环境和温度下, 并在有效期内使用。储存不当或产品过期可能导致错误结果。
3. 为避免交叉污染和气溶胶污染, 试剂加样区和扩增区不能在同一个房间。
4. 试验体系中已经含有终浓度为 2.5mM 的 MgCl₂。当使用粗样品直接进行 RT-qPCR 时, 需要在 2.5~8mM 间优化 MgCl₂ 的终浓度。
5. 检测结束后将反应管及时放入密封袋, 进行无害化处理。
6. 所有检测样本及试剂均按照传染性物质对待, 实验过程中做好工作人员的防护并避免交叉污染。
7. 不能使用过有效期的产品。