

GDSlyo One-step Probe RT-qPCR Kit

货号规格

货号	V5013-A	V5013-B	V5013-C
20-μl 反应数	200 rxns	1,000 rxns	5,000 rxns

产品组成

Component	V5013-A	V5013-B	V5013-C
5X GDSlyo One-step Buffer ^[1]	800 μ l	4 ml	20 ml
GDSlyo One-step Enzyme Mix ^[2]	200 μ l	1 ml	5 ml
3X Excipientc ^[3]	1.2 ml	6 ml	30 ml
50X ROX Reference Dye 1 ^[4]	80 μ l	400 μ l	1 ml \times 2
50X ROX Reference Dye 2 ^[4]	80 μ l	400 μ l	1 ml \times 2
RNase-free ddH ₂ O	1 ml \times 3	15 ml	75 ml

[1] 包含 dNTP/dUTP mix, Mg²⁺。

[2] 包含 Reverse Transcriptase, RNase inhibitor, Heat-labile UDG, Taq DNA Polymerase。

[3] 冻干辅料，在冻干过程中保护酶的活性，维持冻干产品的形态和长期储存稳定性。

[4] 用于校准孔间加样误差。50 \times ROX Reference Dye 1 适用机型包括 ABI 7900HT/7300 real-time PCR System, StepOne Plus; 50 \times ROX Reference Dye 2 适用机型包括 ABI 7500, 7500 Fast, Stratagene Mx3000P; Roche, bio-rad 等品牌机型无需 ROX。

保存条件

-20 $^{\circ}$ C

产品简介

GDSlyo One-step Probe RT-qPCR Kit 是一种无甘油的一步法 RT-qPCR 试剂，包含冻干辅料，适用于通过适当的冻干过程与 RNA 模板一起冻干以进行检测。通过筛选高稳定性的酶和辅料，该产品的储存稳定性与含甘油产品相当；通过选择合适的冻干辅料和匹配冻干过程，提高了冻干产品的产率和稳定性，使得冻干产品可以在室温下存放超过一年。此外，该产品还具有传统甘油试剂的优势，包括良好的多重扩增性能、高特异性和高灵敏度。试剂中加入了 dUTP/UDG 抗污染系统，可以在室温下使用，以消除扩增产物对 qPCR 结果的影响，并确保结果的准确性。

应用举例

1. 准备反应体系

Reaction Volume	20 μ l	
Lyophilization Volume	12 μ l ^[1]	20 μ l ^[1]
5X GDSlyo One-step Buffer	4 μ l	4 μ l

GDSlyo One-step Enzyme Mix	1 μ l	1 μ l
3X Excipientc ^[3]	4 μ l ^[1]	6.7 μ l ^[1]
Primer Forward (10 μ M)	0.4 μ l	0.4 μ l
Primer Reverse (10 μ M)	0.4 μ l	0.4 μ l
TaqMan Probe (10 μ M)	0.2 μ l	0.2 μ l
RNase-free ddH ₂ O	To 12 μ l	To 20 μ l

反应体系中各组分的量可以根据以下原则进行调整：

[1] 冻干体积可以根据需要调整，以确保冻干体积中冻干辅料的最终浓度为 1X。

[2] 引物的最佳范围是 0.1~1.0 μ M。通常情况下，最终浓度为 0.2 μ M 的引物效果良好。

[3] 探针的最佳范围是 50-250 nM。

[4] 扩增产物的长度应在 80-200 bp 的范围内。

2. 冻干程序

Step	Temperature	Time	Vacuum(Pa)
Warehousing	4 $^{\circ}$ C *	-	-
Frozen	4 $^{\circ}$ C	30 min	-
	-40 $^{\circ}$ C	120 min	-
One sublimation	-30 $^{\circ}$ C	600 min	10
Resolve drying	25 $^{\circ}$ C	360 min	10
	40 $^{\circ}$ C	360 min	0

该程序适用于在 12 至 20 微升的原位体积中进行八排冻干，对于冻干珠或更大体积可能需要调整冻干程序。不同制造商和型号的冻干机可能存在差异，可能需要对冻干程序进行优化。

3. 冻干样品复溶

将模板加入到冻干产品中，再加入无 RNase 的 ddH₂O 至 20 微升，充分混合后离心，然后进行扩增。

4. 运行 RT-qPCR 反应程序

标准程序 (灵敏度最高) :

Reverse transcription	55 $^{\circ}$ C ^a	15 min	/
Initial denaturation	95 $^{\circ}$ C	30 sec	/
Circular reaction	95 $^{\circ}$ C	10 sec	45 Cycles
	60 $^{\circ}$ C	30 sec	

快速程序 (适用于大部分应用) ^b:

Reverse transcription	55 $^{\circ}$ C ^a	5 min	/
Initial denaturation	95 $^{\circ}$ C	30 sec	/
Circular reaction	95 $^{\circ}$ C	5 sec	40 Cycles
	60 $^{\circ}$ C	15 sec	

a. 对于具有复杂二级结构或高 GC 含量区域的模板，将逆转录温度提高到 55 $^{\circ}$ C 有助于提高扩增效率和灵敏度。

b. 根据实际使用的实时 PCR 仪器和您自身的需求，可以调整快速程序中每个阶段的反应时间和升温速率。

本品仅供科学研究使用。