

Lyo-Ready One Step RT-qPCR Master Mix

Code No. TCH003

包装量: 1 ml

制品说明:

Lyo-Ready One Step RT-qPCR Master Mix 是一款可冻干的探针法 One Step Real Time RT-PCR 的专用试剂, 适用于原位冻干。本试剂预制成 2X 浓度, 其中含有 PrimeScript RTase、Taq HS、Inhibitor、优化的反应 buffer、dNTP 及冻干保护剂等。本制品无需额外添加冻干保护剂及赋形剂, 即可以直接用于 cake (原位) 冻干, 本试剂也可以添加引物、探针后进行冻干, 冻干后的样品可以室温保存和运输。

保存: -20°C

冻干流程:

将 Lyo-Ready One Step RT-qPCR Master Mix 充分融化, 颠倒混匀后使用, 避免反复冻融, 冻融次数不超过 5 次。

冻干前, Master mix 的浓度可以调整为 1X~2X, 且可以含有引物、探针, 具体冻干的条件需要根据实际情况进行优化。

- 总循环时间和干燥时间可以根据需求调整, 通常预计在 20~30 小时可以完成。
- 在环境温度下长期储存, 请将冻干产品保存在避光的密封袋中, 并放入二氧化硅干燥剂, 且保证环境湿度相对较低。

Master mix 准备 (避光 tube 中配制)

RNase free water	up to 12~20 μ l ^{*1}
Lyo-Ready One Step RT-qPCR Master Mix	10 μ l
Forward Primer(10 μ M)	0.4 μ l ^{*2}
Reverse Primer(10 μ M)	0.4 μ l ^{*2}
Probe(10 μ M)	0.4 μ l ^{*3}

*1 冻干总体积可以根据实际冻干条件及工艺进行优化, 但浓度范围需要控制在 1X~2X, 即添加 10 μ l Lyo-Ready One Step RT-qPCR Master Mix, 总冻干体积需控制在 10~20 μ l。

*2 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果, 反应性能较差时, 可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

*3 使用的探针浓度, 与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关, 试剂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。使用 Thermal Cycler Dice™ Real Time System 时, 通常探针终浓度在 0.1~0.5 μ M 范围内进行调整。

冻干例 (具体冻干条件需根据冻干机、环境因素、溶液体积等进行优化)

1. 将上述 Master mix 轻轻混匀, 并离心, 按照设定的冻干体积分装 (不含引物探针时, 混匀后直接分装 10 μ l) 至放于 96-well rack 的 8-well strips 中。
2. 上盖敞开, 将 rack 放入冻干机。
3. -70°C 预冻 4 小时。
4. -30°C, 150 mTorr 的条件下干燥, 直到一次干燥完成 (\geq 10 小时)。
5. 20°C, 150 mTorr 的条件进行二次干燥 (\geq 10 小时)。
6. 冻干品包装, 环境湿度控制在 10% 以下。

RT-qPCR 反应液配制:

Reaction 准备 (冻干品中不含有引物、探针)

RNase free water	up to 20 μ l
Lyophilized master mix	1 cake
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l ^{*1}
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l ^{*1}
Probe (10 μ M)	0.4 μ l ^{*2}
Template	2 μ l ^{*3}
Total	20 μ l

*1 通常引物终浓度为 0.2 μ M 可以得到较好结果, 反应性能较差时, 可以在 0.1~1.0 μ M 范围内调整引物浓度。

*2 使用的探针浓度, 与使用的 Real Time PCR 扩增仪、探针种类、荧光标记物质种类有关, 试剂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。使用 Thermal Cycler Dice Real Time System 时, 通常探针终浓度在 0.1~0.5 μ M 范围内进行调整。

Reaction 准备 (冻干品中含有引物、探针)

RNase free water	up to 20 μ l
Lyophilized master mix(w/Primers/Probe)	1 cake
Template	2 μ l ^{*3}
Total	20 μ l

*3 模板 RNA 的理想添加量为 10 pg-1 μ g, 添加体积量不要超过反应液总体积的 1/10。如果模板 RNA 添加量超过反应液总体积的 1/10, 可能会对 RT-qPCR 反应有阻碍作用。

使用移液器缓慢吸打, 或使用 vortex 轻轻振荡混匀, 使冻干品的 Master mix 完全溶解后, 轻轻离心将溶液收集至管底。冰上静置 5 分钟后, 轻轻振荡混匀, 再度轻轻离心将溶液收集至管底。

RT-qPCR 反应条件:

52°C 5 min	} 40 cycles
95°C 2 min	
95°C 10 sec	
60°C 30 sec [*]	

(信号采集)

* 仪器不同, 检出步骤有不能设置在 30 秒以内的情况。此时, 请按照该仪器能设定的秒数设置 (31 秒, 34 秒等)。

实验结果分析

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线, 进行 RT-PCR 定量时制作标准曲线等。分析方法参见使用仪器的操作手册。

附录: RNA 样品的制备

本制品是由 RNA 起始合成 cDNA, 然后进行 PCR 扩增的试剂盒。为成功合成 cDNA, 需要抑制样品中含有的 RNase 的作用, 同时需要避免由使用的器具及溶液等外部引入的 RNase 污染。制备 RNA 时, 为避免实验者的汗液或唾液中含有的 RNase 的混入, 操作中应注意尽量不要讲话, 同时戴好一次性手套, 且使用 RNA 操作专用的实验台等。

【器具】尽量使用一次性塑料器皿。

【溶液】试剂、不含核酸酶的灭菌水全部作为 RNA 实验专用。

Thermal Cycler Dice is a trademark of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经 Takara Bio Inc. 书面许可授权或批准, 不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品, 或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。如果您需要其他用途的许可授权, 请联络我们, 或访问我们网站 www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术 (北京) 有限公司制作, 最新版本文件请参考 Takara Bio 中国网站。为正确使用 Takara 产品, 您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

v202411Da

宝日医生物技术 (北京) 有限公司

网址: <https://www.takarabiomed.com.cn>

技术咨询电话

4006518761 4006518769