【产品简介】

TOROIVD® Probe 1-step RT-qPCR 5G Kit 2.0 可在单管内同时进行高灵敏高重复的多重 RT-qPCR 分析，能检测多达 5 个 RNA/DNA 靶点。该试剂盒采用 TaqMan®探针检测病毒，包括 UNG 酶、dsDNase 酶、耐高温 MMLV 逆转录酶、RNase 抑制剂、TOROIVD® 5G DNA 聚合酶和反应缓冲液。改进的酶提高了对 PCR 抑制剂的高耐受性和在酶自身的热稳定性。该一步试剂由于其反应设置简单，适用于高通量分析。该试剂盒适用于高速 RT-qPCR，可实现对目标的准确检测和定量有可能在广泛的动态范围内获得高可重复性和可靠的实时 PCR 结果。

【产品特征】

高速高灵敏

该试剂盒可通过带有探针的一步 RT-qPCR 方法实现低拷贝靶标的快速、高灵敏度的定量，适用于低水平表达的 RNA/DNA 病毒或 mRNA 的定量。

适合多重 RT-qPCR

本试剂已经验证可进行五重 RT-qPCR 分析，实现单管内同时分析多个靶标或内标，降低试剂成本及提高分析效率。

直接 RT-qPCR

本试剂中含有高抗抑制能力强的改造型聚合酶，结合调优过的反应缓冲系统，可以根据不同的样品类型开发 RNA 免提取的直接 RT-qPCR 系统，从而缩短检测时间。

强防污染能力

采用热敏 UNG 酶和微量热敏双链 DNA 核酸酶双酶系统构成强有力的污染清除系统，可有效清除气溶胶中 PCR 扩增产物污染，最大程度避免检测假阳性。

【产品组成】

TOROIVD® Probe 1-step RT-qPCR 5G Kit 2.0（QPR-303UD）采用 25μL 反应体系可使用 200 次。

货号	组分	品名	规格	数量
QPR-303UD	QPR303UD13	RT-qPCR Enzyme Mix UD	260μL/管	1 管
	ASF104BB	2×5G qPCR Buffer BB	1.25mL/管	2 管

备注：

1. RT-qPCR Enzyme Mix UD 包含 TOROIVD® III 逆转录酶，UNG 酶、dsDNase 酶、RNase 抑制剂和 TOROIVD® 5G DNA 聚合酶.。
2. 2×5G qPCR Buffer BB 包含 0.4mM dA/C/G/T/UTP，5mM Mg^{2+}，PCR 反应缓冲液及稳定剂。
3. 工业客户可以根据实际情况订制大包装的单独成分。

【储存条件】

1. 试剂盒-20℃冷冻保存，有效期 24 个月。运输过程中，温度为-15℃到-25℃冷链或干冰。
2. 试剂开封后，置于 4℃条件下保质期为 60 天，-20℃条件下保质期为 24 个月。
3. 2×5G qPCR Buffer BB 请室温完全融化后使用，否则会降低使用效果。

【产品拓展】

在某些特定工业用途下，可以单独订购如下组分对 QPR-303UD 进行拓展使用。

货号	组分	包装
END-UD13	酶稀释液	1.25ml/管；12.5ml/管；40ml/管.
ASF101GB	2×5G qPCR Buffer GB	1.25ml/管；12.5ml/管；40ml/管.
ROX-050	50×ROX 参比染料	100μl/管，1ml/管，10ml/管.
RDB-100	RNA 稀释和储存溶液	100ml/瓶,10L/瓶

备注：

1. 使用酶混合稀释缓冲液(END-UD13)在不改变酶混合物的性能和稳定性的情况下稀释 RT-qPCR 酶混合物。而最大的添加量是每毫升加 1 毫升 RT-qPCR 酶混合。
2. 2×5G qPCR 缓冲液 GB 也可以用于试剂盒中的 2×5GqPCR 缓冲液 BB，用于一些实验应用，具有更高的灵敏度和特异性应用。2×5G qPCR 缓冲液 BB 更适合用于扩增短扩增子(≦100bp)和直接 RT-qPCR。
3. 50×ROX 参考染料用于分析与纠正孔间串扰的仪器，如应用 ABI 公司和安捷伦技术公司的实时荧光 PCR 仪器。反应体系使用以下仪器，如 ABI 7300/7700/7900HT、StepOnePlus 等时，25μL 反应体系加入 0.5μL 50×ROX 参考染料。使用以下仪器，如 ABI7500/7500，安捷伦技术公司的 AriaMx 等时，25μL 反应体系添加 0.05μL 50×ROX。当使用其他品牌仪器时，不需要 ROX 参考染料，如 LightCycler96/LightCycler480 系统（Roche）、CFX96 实时 PCR 检测系统(Bio-Rad)、Smart Cycler System (Cepheid) 等。
4. RNA 稀释和存储溶液是一种缓冲液，比 TE 缓冲液、无 RNase 的水提供更大的 RNA 稳定性。RNA 稀释和存储溶液与直接的一步 RT-qPCR 兼容。

【引物探针设计】

-引物设计

引物长度：18-25bp。Tm 值：60-65℃。GC 含量：40-60%。扩增子长度：70-200 bp。
纯化级别：HPLC 级。

-探针设计

探针设计：20-30bp。Tm 值：65-70℃。GC 含量：40-60%。纯化级别：HPLC 级。

-引物探针验证：

对模板进行 5-8 个梯度的 10 倍稀释，采用新设计引物探针制作标准曲线。确认 PCR 扩增效率在 90% -110% 范围内，且 R^2 值大于等于 0.99。如果不在以上范围内，循环条件需进行调整优化。
如果不能改善结果，要重新设计引物和探针。

【操作流程】

1. 该试剂盒在使用前应完全解冻。斡旋混匀，并短暂地离心。
2. 纯化或粗模板 RNA/DNA 可以直接使用或稀释后使用。
3. 在薄壁 qPCR 管或板中制备以下反应混合物。

组分	25μL 体系添加量
2×5G qPCR Buffer BB	12.5μL
RT-qPCR Enzyme Mix UD	1.3μL
10μM 正向引物	1μL
10μM 反向引物	1μL
10μM TaqMan® 探针	0.4μL
50×ROX	0/0.5/0.05 uL
Template RNA/DNA solution	5μL
ddH_2O	补足 25ul

4. 轻轻混合反应溶液，在微离心机中向下旋转。

注意：

1. 对于未经提取的粗样品，氯化镁浓度可能需要优化调整，推荐最终浓度为 2.5-8mM。可能需要添加 BSA 和 TritonX-100 来提高粗样品裂解能力。
2. 引物浓度应在 0.2-0.8μM 之间优化，TaqMan®探针应在 0.1-0.4μM 之间优化。

【循环条件】

推荐的 2 步法 PCR 方案描述如下所述：

ABI 7500/7300				
步骤		温度	时间	循环数
1	污染处理	37°C	2 min	1
2	逆转录	52°C	5min	1
3	预变性	95℃	1min	1
4	变性	95°C	3 sec	40-45
	退火/延伸	60°C	30 sec	

Bio-Rad CFX96,ABI StepOne Plus				
步骤		温度	时间	循环数
1	污染处理	37°C	2 min	1
2	逆转录	52°C	5min	1
3	预变性	95℃	1min	1
4	变性	98°C	3 sec	40-45
	退火/延伸	60°C	10 sec	

Bioer LineGene 9600 Plus，Roche LightCycler 96 /LightCycler 480 systems				
步骤		温度	时间	循环数
1	污染处理	37°C	2 min	1
2	逆转录	52°C	5min	1
3	预变性	95℃	1min	1
4	变性	95°C	10 sec	40-45
	退火/延伸	60°C	20 sec	

注意：

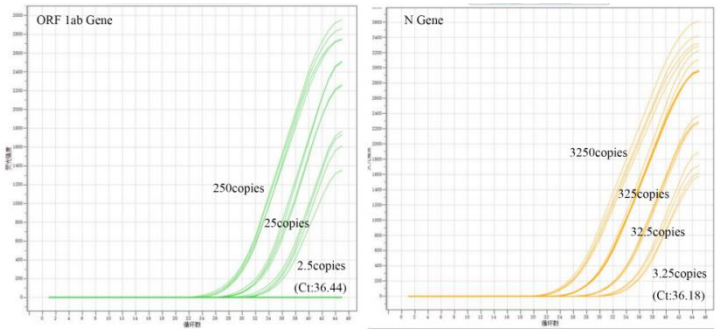
1. 首先使用本方案，必要时优化 PCR 条件。当引物探针 Tm 值较低时，或当 2 步法 PCR 不可行时，使用 3 步法 PCR 扩增。
2. UNG 处理温度可在 25-37℃优化，时间在 0-5min 之间。

3. 逆转录可在 50-60℃之间优化，时间在 2-15min 之间优化。
4. 预变性温度可优化 95-98℃，时间在 2min-5min 之间。
5. 变性温度可以优化 95-98℃，时间在 3 sec-10 sec 之间。
6. 延长/退火温度可优化 60-65℃，时间在 5 sec-30 sec 之间。在此步骤中应设置荧光信号采集。

【应用案例】

实验案例 1: 2-3 拷贝 SARS-CoV-2 RNA 的高灵敏检测

SARS-CoV-2 RNA 标准物质（GBW（E）091111）；
N 基因：2.4×10^5copies/ul;
E Gene：1.8×10^5copies/ul;
ORF1ab 基因：0.70×10^5copies/ul;
稀释倍数：10^3，10^4，10^5 和 10^6。
引物和探针：中国 CDC 推荐
ORF1ab-F：CCCTGTGGGTTTTACACTTAA 终浓度：300nM
ORF1ab-R：ACGATTGTGCATCAGCTGA 终浓度：300nM
ORF1ab-P: FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BHQ1 终浓度：100nM
N-F：GGGGAACTTCTCCTGCTAGAAT 终浓度：600nM
N-R：CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG- 终浓度：600nM
N-P：FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA 终浓度：200nM
反应试剂：*QPR-303UD*
仪器：*Line Gene 9600 Plus Bioer*
结果：



Evolving Enzymes Innovating IVD
天筛（上海）科技有限公司
网址：www.toroivd.com
电话：400-688-2055
邮箱：market@toroivd.com
更多科研产品，请关注天筛优品微信小程序