



## StarScript III One-Step qRT-PCR Probe Kit (UNG)

### StarScript III 一步法 qRT-PCR 试剂盒-探针法 (UNG)

版本号: V220401

货号: A338

保存: -20°C

运输: 低温

货号	规格
A338-01	100 rxn
A338-10	1000 rxn

#### 【产品概述】

StarScript III One-Step qRT-PCR Probe Kit (UNG)是采用探针法进行一步法反转录实时荧光定量检测的专用试剂盒。使用本制品进行 Real Time RT-PCR 反应时以提取的 RNA 为模板,在同一反应管内连续进行反转录和荧光定量检测,操作简单,并能有效防止污染、降低加样误差。本产品内含高效的 StarScript III 反转录酶,热稳定性大幅度提高,可耐受高达 65°C 的反应温度。同时搭配抗体型 HotStart *Taq* DNA 聚合酶、配合优化的 Buffer 体系,在提高检测灵敏度的同时保证了扩增的特异性,非常适合于 RNA 病毒等微量目标基因的检测。

本产品使用时只需加入模板、引物、探针、ROX Reference Dye (用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差,根据不同荧光定量 PCR 仪选择使用)和水,使其工作浓度为 1×,即可进行反应。具有快速简便、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点,可最大限度地减少人为误差、节约 PCR 实验操作时间、降低污染几率。

本产品添加了优化比例的 dUTP,在 *Taq* 酶的扩增过程中可以掺入到合成的 PCR 产物中。该方案特别适合于检测实验室,用于防止 PCR 产物的气溶胶污染:在使用 dUTP 体系的检测室,PCR 程序开始之前先用 UNG 酶(已经预加在试剂盒中)处理反应体系,UNG 酶可以特异性识别含有 dUTP 的 PCR 产物并酶切降解,可以有效防止 PCR 产物的气溶胶污染。

#### 【产品组分】

组分	A338-01	A338-10
StarScript III One-Step Probe Enzyme Mix (UNG)	100 µl	1 ml
2×One-Step Probe StarScript III Buffer (dUTP)	1 ml	5 ml×2
Nuclease-free Water (DEPC-treated)	1 ml	5 ml×2
High ROX Reference Dye	40 µl	400 µl
Low ROX Reference Dye	40 µl	400 µl

\* 注:不同仪器所需 ROX Reference Dye 不同:

需加 High ROX Reference Dye 的机型:ABI Prism7000/7300/7700/7900HT 和 ABI Step One /ABI Step One Plus。

需加 Low ROX Reference Dye 的机型:ABI Prism7500/7500 Fast, MJ Research Chromo4, Opticon (II), Corbett Rotor Gene 3000。

无需加 ROX Reference Dye 的机型: Thermal Cycler Dice Real Time System, LightCycler, Smart Cycler System, Corbett Rotor-gene 6000, Agilent Technologies Mx3000P 等荧光定量 PCR 仪。

#### 【保存条件】

-20°C保存,避光,保质期 12 个月。

#### 【注意事项】

1. 实验过程中请注意避免 RNase 污染。
2. 除酶以外的各种试剂,使用之前请完全溶解并充分混匀,以防因盐离子浓度不均影响实验结果。
3. RNA 模板的完整性对 cDNA 合成效率起着决定性作用,因此请选择可靠的 RNA 提取/纯化方法。建议使用 GenStar 总 RNA 提取试剂和 StarSpin 柱式超纯动物 RNA 小提试剂盒 (Cat#P118、Cat#P132 等)制备高质量的 RNA 模板。
4. 如果扩增片段较长或者 RNA 结构复杂,可以将 RNA 单独置于 65°C 加热 5-10 min 后再加入体系,可提高反转录效率。
5. 本制品只能使用基因特异性引物,不能使用 Random Primer 和 Oligo18 (dT)等进行反转录反应。
6. 当同时需要进行数次 qRT-PCR 反应时,应先配制各种试剂的混合液,然后再分装到每个反应管中。这样可使所取的试剂体积更准确,减少试剂损失,避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作或实验样品之间产生的误差。
7. 使用 StarScript III One-Step Probe Enzyme Mix (UNG)时,应轻轻混匀,避免起泡;分取之前要小心地离心收集到



反应管底部；由于酶保存液中含有 50% 的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。-20℃ 保存，使用后立即放回冰箱。

### 【操作步骤】

1. 按照下表配制反应体系：

组分	体积	终浓度
RNA 模板*	x	≤1 μg
上游引物 GSP (10 μM)	0.8 μl	0.4 μM
下游引物 GSP (10 μM)	0.8 μl	0.4 μM
探针 (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
2×One-Step Probe StarScript III Buffer (dUTP)	10 μl	1×
StarScript III One-Step Probe Enzyme Mix (UNG)	1.0 μl	-
High/Low ROX Reference Dye**	0.4 μl	1×
Nuclease-free Water (DEPC-treated)	补至 20 μl	

\* 以 *Hela* 细胞 Total RNA 模板为例，20 μl 反应体系中加入 Total RNA 的量不超过 1 μg 为宜。

\*\* 请根据 real-time PCR 仪器的型号，选择对应的 ROX Reference Dye。

2. 反应程序设置：

两步法流程	温度	时间	
UNG 酶处理	37°C	5 min	
反转录***	50°C	10 min	
预变性	94°C	2 min	
变性	94°C	15 sec	} 35-45 个循环
退火-延伸*	60°C	45-60 sec	

三步法流程**	温度	时间	
UNG 酶处理	37°C	5 min	
反转录***	50°C	10 min	
预变性	94°C	2 min	
变性	94°C	15 sec	} 35-45 个循环
退火	55-65°C	15 sec	
延伸	72°C	30 sec	

\* 当使用 ABI 仪器时，建议退火-延伸时间设置为 60 sec。

\*\* 当两步法扩增效率不好的时候建议选择三步法进行 qPCR 反应。

\*\*\* 复杂模板逆转录温度可升高至 55-60°C，提高反转录效率。反应时间可根据实验应用场景做适当调整。

3. 在相应的 real-time PCR 仪器上完成实验，并分析实验结果。

### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。