



M-MLV One-Step qRT-PCR(Probe) Kit

【试剂盒组成】

组分	MT701-01 (20 μ l \times 100 rxns)
2 \times One-Step qRT-PCR MasterMix(Probe)	1 ml
H ₂ O(RNase free)	1 ml

【贮藏及有效期】 试剂盒-20℃以下冷冻避光保存，有效期为 12 个月。

【产品简介】

采用了探针法 (TaqMan) 一步qRT-PCR 方案。反转录与 qPCR 反应在同一反应体系中连续进行，反应中不需添加任何试剂，操作简单，并能有效防止污染。反转录反应为本公司开发的 M-MLV Reverse Transcriptase。该反转录酶去除 RNase H 活性，合成能力高、热稳定性好和半衰期长的特点。该反转录酶最高可在 60℃进行反转录反应，因此对高 GC 含量和具有复杂二级结构的 RNA 模板具有超强的延伸能力；qPCR 反应使用了扩增性能优越的 DNA 聚合酶，检测精确度更高，灵敏度更高。本制品可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对多种丰度的靶 基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。

【产品特点】

利用 M-MLV Reverse Transcriptase 高效将 RNA 合成 cDNA，操作简单。

对高 GC 含量和具有二级复杂结构的 RNA 模板具有超强的延伸能力。

只能使用特异引物，不能使用 Oligo(dT)和Random Primer。

【使用方法】

实验前 5 分钟左右将试剂从冰箱取出并恢复至室温，使其完全融化，充分混匀后瞬时离心去除管壁吸附液体。

配制反应体系

成分	体积	终浓度
2 \times One-Step qRT-PCR MasterMix(Probe)	10 μ l	1 \times
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.1-0.2 μ M ^{*1}
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.1-0.2 μ M ^{*1}
Probe	0.4 μ l ^{*2}	
模板样品	2 μ l ^{*3}	
H ₂ O(RNase free)	To 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 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，实际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。

*3 模板使用量依据具体实验而定，建议 RNA 使用量在 10-100ng。

扩增程序

操作方法^{*1}

反转录反应

42℃ 5 min^{*2}

95℃ 30 sec

PCR 反应

95℃ 10 sec

60℃ 30 sec } 40-45 Cycles

*1 如果所用仪器有特殊使用程序，请参照仪器说明书进行。

*2 反转录温度与时间可根据模板的具体情况进行调整。一般反转录温度可在 42-60℃之间调整；反转录时间可在 5-30 min 之间调整。

【注意事项】

- (1) 所有试剂应在规定温度储存。 -20℃保存的试剂在使用前应充分混匀。试剂盒避免反复冻融。
- (2) 实验操作应按照国家有关临床基因扩增实验室管理规范执行，实验过程应分区（试剂准备区、样本制备区、核酸扩增区），各区物品为专用，不得交叉使用，避免污染。
- (3) 操作台、移液器、离心机等仪器用品应经常用 1%次氯酸钠、75%乙醇或紫外灯进行消毒。耗材应进行无酶处理。
- (4) 待检样本、试剂盒组份及实验中的废弃物需按照具有潜在传染性物质处理方法进行处理。
- (5) 为防止荧光干扰，应避免使用含荧光物质手套，避免用手直接接触，预防交叉污染。
- (6) 检测结果为阴性，并不完全代表为非感染状态，具体诊断需结合兽医临床。
- (7) 产生假阴性的可能原因为：待检样本在采集、运输、保存及核酸提取过程中操作不当造成 DNA 降解；样本中核酸浓度低于最低检测限；病毒待测靶基因出现变异；未经验证的其他干扰因素。
- (8) 产生假阳性的可能原因为：待检样本采集、运输及核酸提取过程中发生交叉污染。

BM20210602