

One-Step RT-dPCR SHENmix Kit for Probes (5×)

使用说明书

货号: 1701883 (仅供研究用)

一、简介

试剂盒专为检测以 RNA 为模板的数字 PCR 实验而设计, 其实现了逆转录和 PCR 反应的闭管系统, 从而避免额外的开管、移液等操作, 降低污染风险, 缩短操作时间。本试剂盒主要由在室温下无活性的热启动 Taq 酶、最佳反应温度为 50°C 的逆转录酶、防止 RNA 模板降解的 RNA 酶抑制剂以及经过优化的缓冲体系组成, 适用于荧光探针法数字 PCR 的检测系统。

二、组分

表 1. 试剂盒组分

序号	组分	装量	储存条件
1	One-Step RT-dPCR Mix (5×)	500μl×2 管	-18°C 及以下, 避光
2	dPCR Enhancer	250μl×1 管	-18°C 及以下, 避光
3	RT-PCR 级水	1.5ml×2 管	-18°C 及以下

三、规格

200 Reactions (25μl/Reactions)

四、有效期

规定储存条件下 24 个月, 具体见试剂盒标签。

五、保存条件

试剂盒应在 -18°C 及以下, 避光保存。

六、适用仪器

适用于 naica® 全自动微滴芯片数字 PCR 系统。

七、注意事项

试剂盒使用前请认真阅读以下注意事项:

- ❖ 试剂盒应在 -18°C 及以下, 避光保存。
- ❖ 使用前请先将试剂盒置于室温下完全解冻。为避免在存储过程中出现分层, 需在涡旋振荡仪上垂直低速涡旋混匀 30s, 期间每隔 10s 于迷你离心机上快速离心一次 (共需离心三次)。注意应垂直涡旋, 避免起泡。

八、使用操作

1. 用 RT-PCR 级水稀释 RNA 模板至所需浓度 (参考芯片推荐的浓度范围), 置于冰上备用。

2. 将试剂盒各组份置于室温下解冻。在涡旋振荡仪上垂直低速涡旋混匀 30s, 期间每隔 10s 于迷你离心机上快速离心一次 (共需离心三次)。注意应垂直涡旋, 避免起泡。

3. 配制 RT-dPCR 预混液 (不添加模板), 具体配比参见表 2。配制时, 根据所需反应孔数需多配制 10% 的孔数, 以避免操作过程中的体积损失。例如, 当反应孔数为 20 孔时配制 22 孔的预混液用量。将配制好的预混液在涡旋振荡仪上垂直低速涡旋混匀 30s, 期间每隔 10s 于迷你离心机上快速离心一次 (共需离心三次)。注意应垂直涡旋, 避免起泡。

将上述配制完成的预混液平均分配至各反应管中, $V_{\text{单管}} = V_{\text{单孔总体积}} - V_{\text{单孔模板体积}}$ 。之后再加入模板, 得到 RT-dPCR 反应液。将配制好的 RT-dPCR 反应液在涡旋振荡仪上垂直低速涡旋混匀 30s, 期间每隔 10s 于迷你离心机上快速离心一次 (共需离心三次)。注意应垂直涡旋, 避免起泡。

表 2. RT-dPCR 反应液配制

试剂组份	25 μ l 体系 (Sapphire 芯片)	7 μ l 体系 (Opal 芯片)
One-Step RT-dPCR Mix (5 \times)	5 μ l	1.4 μ l
dPCR Enhancer	1.25 μ l	0.35 μ l
Primer-F	1 μ M (终浓度)	1 μ M (终浓度)
Primer-R	1 μ M (终浓度)	1 μ M (终浓度)
Probe	250nM (终浓度)	250nM (终浓度)
荧光素钠盐	100nM (终浓度)	100nM (终浓度)
RNA 模板	0.2-20000 拷贝/ μ l (终浓度)	0.7-40000 拷贝/ μ l (终浓度)
RT-PCR 级水	补到 25 μ l	补到 7 μ l

4. 将 RT-dPCR 反应液添加到相应的芯片孔井中。不要与内置油相接触, 移液枪打至第一档即可, 避免引入气泡。

- ❖ 引物、探针的终浓度可根据实验需要进行优化。
- ❖ 上述第 2、3 这两个步骤需特别注意充分混匀, 否则可能会造成微滴不均一或检测拷贝数不稳定的现象。
- ❖ RT-dPCR 反应液振荡结束后应尽快将其添加至芯片孔井中, 前后时间间隔建议少于 3min。

5. RT-dPCR 反应程序

请根据实际实验情况, 选择适合的反应程序。基于 Naica™ Sapphire 芯片设置的反应程序参见表 3, 基于 Naica™ Opal 芯片设置的反应程序参见表 4。

表 3. Naica™ Sapphire 芯片 RT-dPCR 反应程序 (示例)

步骤	温度 (°C)	压力 (mbar)	持续时间
分区	40	AP 到+950	12min
cDNA 合成	50	+950	15min
预变性	95	+950	30s
PCR (40-45 个循环)	95	+950	10s
	60	+950	40s
释压	25	AP	33min

表 4. Naica™ Opal 芯片 RT-dPCR 反应程序 (示例)

步骤	温度 (°C)	压力 (mbar)	持续时间
分区	25	AP 到+950	1h
cDNA 合成	50	+950	15min
预变性	95	+950	30s
PCR (40-45 个循环)	95	+950	10s
	60	+950	40s
释压	25	AP	10min

❖ 初次使用未知引物时, 请首先尝试三步法 PCR 程序。退火温度可根据引物的 T_m 值在 55°C~65°C 之间进行调整。

服务支持



湖州申科生物技术有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910