

GDSIyo Fast Direct One-step

Probe RT-qPCR Kit (NAF)

货号规格

货号	V5018F-A
25- μ l 反应数	2,000 rxns

产品简介

GDSIyo Fast Direct One-step Probe RT-qPCR Kit (NAF) 是一款专为冻干工艺优化设计的、免核酸提取的一步法探针法逆转录定量 PCR 试剂。本品采用经基因工程改造的快速耐热逆转录酶与高保真热启动 DNA 聚合酶优化组合, 配合高效反应缓冲体系, 可在 20–40 分钟内完成全程扩增, 显著提升检测效率。本品具有极强的抑制物耐受性, 可直接用于多种血液样本、拭子、唾液等样本的靶基因检测; 同时兼容各类快速 PCR 仪及快速扩增程序, 满足高通量、快检的应用需求。试剂内置优化的 qPCR 缓冲液与 dUTP/温敏型 UDG 防污染系统, 可有效杜绝气溶胶和产物残留导致的假阳性问题。产品冻干成型性好, 稳定性优异, 适用于常温储运及多种分子诊断场景。

本品经特殊工艺处理, 无外源 DNA 残留, 符合生物制药、细胞治疗、疫苗质量控制等高标准应用需求。

产品组成

Component	V5018F-A
5X GDSIyo Fast Direct One-step Buffer (NAF) ^[1]	10 mL
50X GDSIyo Fast Direct Polymerase (NAF)	1 mL
50X GDSIyo Fast Direct RTase (NAF)	1 mL
50X MgCl ₂	1 mL
4X Lyoprotectant ^[2]	12.5 mL

[1] 包含 dNTP/dUTP mix, 不含 Mg²⁺。

[2] 冻干保护剂, 在冻干过程中保护酶的活性。

保存条件

-20°C。

应用范围

制备冻干 RT-qPCR 试剂, 病毒样本等 RNA 快速检测 IVD 产品开发, 多重靶标 RNA 一步法 RT-qPCR 实验等。

质量控制

纯度检测: 经质量检测, 产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测: 经不同来源的模板和引物检测, 产品具有优秀的特异性、灵敏性及可重复性等。

应用举例

1. 制备冻干样品

1.1 配制冻干体系

参考冻干体系:

Component	25 μ l-rxn	Final Conc.
5X GDSIyo Fast Direct One-step Buffer (NAF)	5 μ l	1X
50X GDSIyo Fast Direct Polymerase (NAF)	0.5 μ l	1X
50X GDSIyo Fast Direct RTase (NAF)	0.5 μ l	-
50X MgCl ₂	0.5 μ l	-
4X Lyoprotectant	6.25 μ l	-
Primer Probe Mix	1 μ l	-
RNase-free ddH ₂ O	to 18-20 μ l	-

1.2 运行冻干反应

25- μ l 体系原位冻干工艺参考冻干条件:

Step	Temp.	Time	State	Vacuum
Freezing	4°C	30 min	Hold	1 atm
	-50°C	60 min	Cooling	
	-50°C	210 min	Hold	
Primary Drying	-30°C	60 min	Warming	Ultimate Vacuum
	-30°C	720 min	Hold	
Primary Drying	25°C	60 min	Warming	Ultimate Vacuum
	25°C	300 min	Hold	

对于冻干珠或更大体积的冻干可能需要调整冻干程序。

不同制造商和型号的冻干机存在差异, 可能需要对冻干程序进行优化。

2. 冻干样品复溶/准备反应体系

2.1 将冻干粉进行瞬时离心收集至管底。

2.2 将模板 RNA 和无 RNase 的 ddH₂O 加入到冻干产品中, 参照下表配制反应体系:

Form	Component	25 μ l-rxn	Final Conc.
Lyophilized Powder	5X GDSIyo Fast Direct One-step Buffer (NAF)	5 μ l	1X
	50X GDSIyo Fast Direct Polymerase (NAF)	0.5 μ l	1X
	50X GDSIyo Fast Direct RTase (NAF)	0.5 μ l	-
	50X MgCl ₂	0.5 μ l	-
	4X Lyoprotectant ^[1]	6.25 μ l	-

	<i>Primer Probe Mix</i> ^[2]	1 μ l	-
<i>Liquid</i>	<i>Sample</i> ^[3]	<i>Variable</i>	-
<i>Liquid</i>	<i>RNase-free ddH₂O</i>	to 25 μ l	-

[1] 在无冻干需求或非测试冻干产品性能场景下可不加入冻干保护剂。

[2] 引物的终浓度最佳范围是 0.1~1.0 μ M。通常情况下，0.2 μ M 的引物效果良好。探针的终浓度最佳范围是 0.1~0.3 μ M。

[3] 建议用无核酸酶的超纯水或 TE 缓冲液稀释样本后再加样，并通过测试确定不同样本的最佳加样量。部分样本建议加样量请参考下表：

样本	50 μ l-rxn 建议加样量	最大加样比例
抗凝全血	2.5 μ l	5%
咽拭子	10 μ l	20%

2.3 充分混匀，瞬时离心。

3. 运行 RT-qPCR 反应程序

常规程序，参照下表设置：

Stage	Temp.	Time	Cycles
<i>Reverse transcription</i>	50°C ^[1]	10-20 min	/
<i>Initial denaturation</i>	95°C	1-5 min	/
<i>Circular reaction</i>	95°C	10-20 sec	40-50
	56-64°C	20-60 sec	

[1] 可在 42-55°C 温度范围及 5-30 min 时间范围内优化逆转录反应。

[2] 以下情况建议采用三步法扩增：引物退火温度较低、目标片段 > 200 bp、扩增效率较低。

快速程序，参照下表设置：

Stage	Temp.	Time	Cycles
<i>Reverse transcription</i>	50°C	5 min	/
<i>Initial denaturation</i>	95°C	30 sec	/
<i>Circular reaction</i>	95°C	1-3 sec	40-45
	56-64°C	3-20 sec	

本品仅供科学研究使用。