

Fluorescent RT Isothermal Amplification Kit (Lyophilized)

REF: EG23106S

储运条件

2~8°C保存, 常温运输, 严格防潮, 不可剧烈振荡。

产品组成

组分	规格
Lyophilized Fluorescent RT Iso-amplification Mix (25 µl/rxn)	48 rxns
Mg(OAc) ₂ (280 mM)	200 µl

产品简介

本品是通过液氮点液冻干技术制备的即用型逆转录 - 荧光法恒温扩增试剂盒, 含有除引物、模板和探针外的所有组分。用户仅需加入 RNA 模板、引物、EXO 荧光探针、Mg²⁺ 和水, 即可在 37~42°C 恒温下快速完成 RNA 逆转录与 cDNA 扩增, 并可实时检测荧光信号。

质量控制

核酸内切酶活性

将 1 颗 Lyophilized Fluorescent RT Iso-amplification Mix 溶于 25 µl ddH₂O, 再与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 在 37°C 下共同温育 4 h, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 少于 10% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

RNase 活性

将 1 颗 Lyophilized Fluorescent RT Iso-amplification Mix 溶于 25 µl ddH₂O, 再与 500 ng 总 RNA 在 37°C 下温育 1 h, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 超过 90% 的 RNA 仍保持完整。

使用方法

1. 按下表配制反应体系：

试剂	使用量	终浓度
Lyophilized Fluorescent RT Iso-amplification Mix (25 µl/rxn)	1 颗	
RNA 模板	5 µl	
正向引物 (10 µM) ^a	1 µl	0.4 µM
反向引物 (10 µM) ^a	1 µl	0.4 µM
EXO 探针 (10 µM) ^b	0.3 µl	0.12 µM
ddH ₂ O	To 23.7 µl	

a. 引物长度建议为 30~35 nt，内部无二级结构和连续单碱基重复序列，引物 Tm 不作考虑。扩增目标片段长度建议为 200~500 bp。

b. 探针设计参考 <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2021.06.001>

2. 待微球完全溶解后，在反应管盖上加上 1.3 µl Mg(OAc)₂ (280 mM)。小心盖紧管盖，上下颠倒 5 次，瞬时离心收集至管底。

3. 迅速将反应管放入预热好的荧光扩增设备中，在 37~42°C（建议 40°C）下恒温反应 20~30 min，每隔 30 s 采集一次荧光信号。

注意事项

1. 扩增产物的气溶胶易造成假阳性，为避免交叉污染，建议有条件的用户在基因扩增实验室内操作，加样与扩增在不同区域进行。

2. 实验时应设置不加模板的空白对照（建议使用开盖无菌水），以确认是否有待扩增核酸的污染。