



Taq[®]LysFast TaqMan Direct RT-qPCR Kit

使用前请仔细阅读说明书

货号：BFRD008

包装规格：250T

储存条件：

1. 试剂盒-20℃冷冻保存，有效期 24 个月。运输过程中，温度为-15℃到-25℃冷链或干冰。
2. 试剂开封后，置于 4℃条件下保质期为 60 天，-20℃条件下保质期为 24 个月。
3. 2×Buffer 请室温完全融化后使用，否则会降低使用效果。

试剂盒组成：

品名	规格×数量
LysFast Enzyme Mix	250 μL×1管
2×Buffer	1.25 ml×2管

- 备注：** 1. LD RT-qPCR Enzyme Mix 包含逆转录酶，UNG 酶、dsDNase 酶、RNase 抑制剂和 DNA 聚合酶。
2. 2×Buffer 包含 0.4mM dA/C/G/T/UTP，5mM Mg²⁺，PCR 反应缓冲液及稳定剂。

产品描述：

Taq[®]LysFast TaqMan Direct RT-qPCR Kit 可在单管内同时进行高灵敏高重复的多重 RT-qPCR 分析，能检测多达 5 个 RNA/DNA 靶点。该试剂盒采用 TaqMan[®]探针检测病毒，包含 UNG 酶、dsDNase 酶、耐高温 MMLV 逆转录酶、RNase 抑制剂、DNA 聚合酶和反应缓冲液。升级后的酶提高了对 PCR 抑制剂的高耐受性和酶自身的热稳定性。

样本可用杭州大鱼探柯生物科技有限公司研发生产的 Taq[®]核酸释放剂（高效型）（货号：BFT1011/BFT1012）和非接触超声处理仪（货号：BFTAQ TS-N16）裂解产物直接进行反应。该体系由于操作步骤、反应设置简单，适用于高通量分析。该试剂盒适用于高速 RT-qPCR，可实现对目标的准确检测和定量，可能在广泛的动态范围内获得可高重复性和可靠的实时 PCR 结果。

产品特征：

- 高速高灵敏：该试剂盒可通过带有探针的一步 RT-qPCR 方法实现低拷贝靶标的快速、高灵敏度的定量，适用于低水平表达的 RNA/DNA 病毒或者 mRNA 的定量。
- 适用于多重 RT-qPCR：本试剂盒已经验证可进行五重 RT-qPCR 分析，实现单管内同时分析多个靶标或内标，降低试剂成本及提高分析效率。
- 免提取直接 RT-qPCR：样本可用 BFTAQ[®]核酸释放剂（高效型）（货号：BFT1011/BFT1012）和非接触超声处理仪（货号：BFTAQ TS-N16）裂解产物直接进行 RT-qPCR 反应，从而缩短检测时间。
- 强防污染能力：采用热敏 UNG 酶和微量热敏双链 DNA 核酸酶双酶系统构成强有力的污染清除系统，可有效清除气溶胶中 PCR 扩增产物污染，最大程度避免检测假阳性。。

引物探针设计：

-引物设计



引物长度：18-25bp。T_m 值：60-65℃。GC 含量：40-60%。

扩增子长度：70-200bp。

纯化级别：HPLC 级。

一、探针设计

探针设计：20-30bp。T_m 值：65-70℃。GC 含量：40-60%。纯化级别：HPLC 级。

一、引物探针验证：

对模板进行 5-8 个梯度的 10 倍稀释，采用新设计引物探针制作标准曲线。确认 PCR 扩增效率在 90%-110% 范围内，且 R² 值大于等于 0.99。如果不在以上范围内，循环条件需进行调整优化。

如果不能改善结果，要重新设计引物和探针。

操作步骤：

1. 样本裂解：采用 Taq[®]核酸释放剂（高效型）（货号：BFT1011/BFT1012）和非接触超声处理仪（货号：BFTAQ TS-N16）对唾液、口腔拭子、鼻咽拭子、细胞悬液、组织块等动物样本，或根、茎、叶、花、种子等植物样本进行裂解操作。具体操作步骤请参考 BFTAQ[®]核酸释放剂（高效型）使用说明书（BFT1011/BFT1012）。

2. 体系制备：该试剂盒在使用前应完全解冻，轻柔混匀，并短暂地离心；纯化、超声裂解或粗裂解模板 RNA/DNA 可以直接使用或稀释后使用。在薄壁 qPCR 管或板中，按以下表体系配制反应体系：

组分	20 μL 体系添加量
LysFast Enzyme Mix	1 μL
2×Buffer	10 μL
10 μM 正向引物	1 μL
10 μM 反向引物	1 μL
10 μM TaqMan [®] 探针	0.3 μL
Template RNA/DNA solution	4 μL
ddH ₂ O	补足到 20 μL

3. 轻轻混合反应溶液，在掌上离心机中向下旋转。

注意：1. 对于未经提取的粗样品，氯化镁浓度可能需要优化调整，推荐最终浓度为 2.5-8mM。可能需要添加 BSA 和 TritonX-100 来提高粗样品裂解能力。

2. 引物浓度应在 0.2-0.8 μM 之间优化，TaqMan[®]探针应在 0.1-0.4 μM 之间优化。

循环条件：

推荐的 2 步法 PCR 方案描述如下所述：

步骤	温度	时间	循环数
1	37℃	2 min	1
2	52℃	5 min	1
3	95℃	1 min	1
4	95℃	3 sec	40-45
	60℃	30 sec	



注意:

1. 首先使用本方案，必要时优化 PCR 条件。当引物探针 T_m 值较低时，或当 2 步法 PCR 不可行时，使用 3 步法 PCR 扩增。
2. UNG 处理温度可在 25-37°C 优化，时间在 0-5min 之间。
3. 逆转录可在 50-60°C 之间优化，时间在 2-15min 之间优化。
4. 预变性温度可优化 95-98°C，时间在 2min-5min 之间。
5. 变性温度可以优化 95-98°C，时间在 3sec-10sec 之间。
6. 延长/退火温度可优化 60-65°C，时间在 5sec-30sec 之间。在此步骤中应设置荧光信号采集。

基础信息:

生产企业: 杭州大鱼探柯生物科技有限公司

地 址: 浙江省杭州市西湖区三墩镇灯彩街 1009 号云谷中心 B1 号楼 603-1 室

版 本 号: V1-202601