HiScript® II One Step qRT-PCR Probe Kit

Q222-01

Version 5.1

Vazyme

Vazyme biotech co., ltd.

产品简介

HiScript® II One Step qRT-PCR Probe Kit专为以RNA为模板（如RNA病毒)的定量PCR检测而设计。使用基因特异引物（GSP)，逆转录和PCR反应在一管内完成，不需要额外的开管/移液操作，大大提高了检测通量，并降低了污染的风险。整合HiScript® II Reverse Transcriptase以及热启动的Champagne Taq™ DNA Polymerase的优越性能，配合经过优化的缓冲体系，HiScript® II One Step qRT-PCR Probe Kit的检测灵敏度可达到0.1 pg总RNA或<10个拷贝的RNA模板。试剂盒以便捷的Master Mix形式提供。2 × One-Step Q Probe Mix包含优化的缓冲体系和dNTP，适用于荧光标记探针（例如，TaqMan®)的高特异性检测系统；One-Step Q Probe Enzyme Mix包含比例优化的HiScript® II Reverse Transcriptase、RNase inhibitor以及Champagne Taq™ DNA Polymerase。

产品组成

组 分	Q222-01 100 rxn (50 μl/rxn)
RNase free ddH_2O	1.25 ml × 2
2 × One Step Q Probe Mix [a]	1.25 ml × 2
One Step Q Probe Enzyme Mix [b]	250 μl
50 × ROX Reference Dye 1 [c]	100 μl
50 × ROX Reference Dye 2 [c]	100 μl

a. 包含dNTP Mix，Mg^{2+}。

b. 包含HiScript® II Reverse Transcriptase、RNase inhibitor以及Champagne Taq™ DNA Polymerase。

c. 用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。使用ABI 7900HT/ 7300 Real-Time PCR System和StepOne Plus™时使用50 × ROX Reference Dye 1；ABI 7500, 7500 Fast Real-Time PCR System，Stratagene Mx3000P使用50 × ROX Reference Dye 2；Roche, Bio-Rad的Real Time PCR仪不必使用ROX。

储存条件

-20℃保存。

质量控制

所有组分经检测均无核酸外切酶，核酸内切酶，RNase残留。

功能测试：以HeLa细胞总RNA为模板，扩增B2M基因。扩增效率在0.95-1.05之间，且模板量为1 pg时Ct值在35以内。

应用实例（以ABI StepOnePlus™为测试机型）

1. 在RNase free离心管中配制如下混合液

RNase free ddH_2O	to 20 μl
2 × One Step Q Probe Mix	10 μl
One Step Q Probe Enzyme Mix	1 μl
50 × ROX Reference Dye 1	0.4 μl
Gene Specific Primer Forward (10 μM) [a]	0.4 μl
Gene Specific Primer Reverse (10 μM) [a]	0.4 μl
TaqMan Probe (10 μM) [b]	0.2 μl
模板RNA [c]	Total RNA: 0.1 pg-1 μg

注：反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

a. 一般来说反应体系中引物终浓度为0.2 μM即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在0.1-1.0 μM范围内调整引物浓度。

b. 探针终浓度可以在50 nM-250 nM之间调整

c. qPCR灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后 (如稀释至2-5 μl/样本)加入反应体系中， 这样可以有效提高实验的重复性。

d. 扩增产物长度请选择在80 bp-200 bp范围内。

2. 按下列条件进行One Step qRT-PCR反应

标准程序（可获得最高的扩增灵敏度）

Stage 1	逆转录	Reps: 1	50 ℃ [a]	15 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95 ℃	5 min
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95 ℃	10 sec
			60 ℃	30 sec [b]

快速程序（可满足大部分应用）

Stage 1	逆转录	Reps: 1	50 ℃ [a]	5 min
Stage 2	预变性	Reps: 1	95 ℃	2 min
Stage 3	循环反应	Reps: 45	95 ℃	10 sec
			60 ℃	30 sec

a. 对于具有复杂二级结构或高GC区域的模板，将逆转录温度提高到55℃，有助于提高扩增效率和灵敏度。

b. 延伸时间请根据您使用的Real Time PCR仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用ABI 7700和7900HT时至少30秒；使用ABI 7000和7300时至少31秒；使用ABI 7500时至少34秒。

3. 反应结束后确认Real Time PCR的扩增曲线，进行标准曲线制作等。不要用电泳检测，以防止扩增产物污染。

注意事项：

1. One Step Q Probe Enzyme Mix 含有高浓度的甘油，使用前请短暂离心，收集到反应管底部，并用移液枪轻轻吸打，充分混匀后准确吸取。
2. 反应液的配制请使用RNase free 枪头，EP 管等，尽量避免污染。