

HiScript® II One Step qRT-PCR SYBR® Green Kit

Q221-01

Version 5.1



Vazyme biotech co., ltd.

产品简介

HiScript® II One Step qRT-PCR SYBR® Green Kit采用SYBR® Green I 嵌合荧光法, 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Champagne Taq™ DNA Polymerase的优越性能, 配合经过优化的缓冲体系, One Step qRT-PCR SYBR® Green Kit的检测灵敏度可达到1 pg 总RNA。Buffer中加入的增强因子可以有效减少引物二聚体的形成, 提高特异性。试剂盒以便捷的Master Mix形式提供。2 × One Step SYBR® Green Mix包含优化的缓冲体系、dNTP、特异性增强因子和SYBR® Green I 荧光染料; One Step SYBR® Green 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 | Q221-01 100 rxn (50 µl/rxn) |
|----------------------------------------------|-----------------------------|
| RNase free ddH ₂ O | 1.25 ml × 2 |
| 2 × One Step SYBR® Green Mix ^a | 1.25 ml × 2 |
| One Step SYBR® Green 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, Mg²⁺特异性增强因子, SYBR® Green I。

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仪时不必使用ROX。

储存条件

-20°C保存。2 × One Step SYBR® Green Mix -20°C避光保存。

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 ₂ O | to 20 µl |
| 2 × One Step SYBR® Green Mix | 10 µl |
| One Step SYBR® Green 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) | 0.4 µl |
| 模板RNA ^b | Total RNA: 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. 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。因此推荐您将模板稀释后(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。

c. 扩增产物长度请选择在100 bp-500 bp范围内, 尤其推荐100 bp-200 bp之内。

2. 按下列条件进行One Step qRT-PCR反应

| | | | | |
|---------|------|----------|--------------------|--------------------|
| Stage 1 | 逆转录 | Reps: 1 | 50 °C ^a | 3 min ^b |
| Stage 2 | 预变性 | Reps: 1 | 95 °C | 5 min |
| Stage 3 | 循环反应 | Reps: 40 | 95 °C | 10 s |
| | | | 60 °C | 30 s ^c |
| Stage 4 | 融解曲线 | Reps: 1 | default | |

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°C，有助于提高扩增效率和灵敏度。

b. 逆转录时间可延长至15 min，有助于提高cDNA产量。

c. 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的扩增曲线及融解曲线，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 SYBR® Green 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. 使用2 × One Step SYBR® Green Mix 时，请充分混匀后准确吸取，避免强光照射，并注意避光保存。
3. 反应液的配制请使用RNase free 枪头，EP管等，尽量避免污染。