

HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR

R222-01

Version 5.1



Vazyme biotech co., ltd.

产品简介

HiScript® II Reverse Transcriptase是在M-MLV (RNase H-) Reverse Transcriptase基础上通过体外分子进化技术得到的全新逆转录酶，大幅提高了热稳定性和cDNA合成效率。HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR 适用于两步法RT-qPCR检测，5 × Mix 中含有逆转录反应所需的所有组分 (Buffer、dNTP Mix、HiScript® II Reverse Transcriptase、RNase inhibitor、Random primers/Oligo dT primer mix)，加入模板RNA和水即可迅速进行反应。RNA模板的体积最多可加到总体积的80%，非常适合于低浓度RNA模板的逆转录反应。5 × Mix在-20℃不会冻结，使用方便。

本产品针对qPCR进行特别优化，比例优化的Random primers/Oligo dT primer mix，使cDNA合成可从RNA转录本的各个区域起始，最大程度保证了qPCR结果的可重复性。逆转录产物兼容SYBR® Green和探针法qPCR，可以根据实验目的，选择AceQ® qPCR SYBR® Green Master Mix (Q111) 或AceQ® qPCR Probe Master Mix (Q112)等试剂配合使用，进行高性能的基因表达分析。

产品组成

组 分	R222-01 200 rxn (10 µl/rxn)
RNase free ddH ₂ O	1 ml × 2
5 × HiScript® II qRT SuperMix ^a	400 µl
5 × No RT Control Mix ^b	40 µl

a. 包含Buffer、dNTP、HiScript® II Reverse Transcriptase、RNase inhibitor、Random primers/Oligo dT primer mix。

b. 除不含HiScript® II Reverse Transcriptase外，其余成分与5 × HiScript® II qRT SuperMix相同，用于配制No RT对照反应。

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。

功能检测：以1 pg-1 µg HeLa cell total RNA为模板，测试qRT-PCR性能。以6个数量级的模板量的对数值对Ct值做标准曲线，R²>0.990，斜率在-3.20到-3.60之间。

实验准备和指南

用户需要自行准备的材料

- RNase free的1.5 ml微量离心管或0.2 ml PCR管
- 水浴锅或PCR仪
- 冰

RNA

- 高质量的完整的RNA对于获得高质量的cDNA是至关重要的。请用电泳验证RNA的完整性。

qPCR指南

第一链cDNA产物可直接用作PCR反应的模板。建议作为模板的cDNA产物的体积不超过qPCR反应体积的1/10。可选择AceQ® qPCR SYBR® Green Master Mix (Q111) 或 AceQ® qPCR Probe Master Mix (Q112) 作为qPCR试剂。

应用实例

1. 配制第一链cDNA合成反应液

在RNase free离心管中配制如下混合液

RNase free ddH ₂ O	to 10 µl
5 × HiScript® II qRT SuperMix	2 µl
模板RNA	Total RNA: 1 pg-500 ng

用移液器轻轻混匀。

No RT Control反应(可选)

No RT Control是指不加逆转录酶的逆转录阴性对照反应，用于检验RNA模板中是否有基因组DNA残留。

在RNase free离心管中配制如下混合液

RNase free ddH ₂ O	to 10 µl
5 × No RT Control Mix	2 µl
模板RNA	Total RNA: 1 pg-500 ng

用移液器轻轻混匀。

2. 进行逆转录反应

标准程序(可获得最高产量的cDNA)

25 °C	10 min
50 °C*	30 min
85 °C	5 min

或：快速程序(适用于大多数RT-qPCR实验，效果与标准程序相当)

50 °C*	15 min
85 °C	2 min

* 如果模板具有复杂二级结构或高GC区域，可将反应温度提高至55°C，有助于提高产量。

产物可立即用于PCR反应，或在-20 °C保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-80 °C保存。cDNA应避免反复冻融。

注意事项

- 5 × HiScript® II qRT SuperMix及5 × No RT Control Mix含有高浓度的甘油，在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。
- 10 µl逆转录反应体系建议加入不超过500 ng的Total RNA。如果目的基因表达量非常低，最多加入1 µg Total RNA，否则加入RNA量过高，可能会超出后续定量PCR的线性范围。反应体积可根据需要等比例放大。
- 如果加入RNA模板体积较大（如超过2 µl），请确保RNA是溶于水而不是TE中，因为TE中的EDTA会对逆转录反应产生抑制。
- 如果在QPCR实验中发现No RT Control的Ct值与实验组相差<5，则说明RNA模板有可能污染了基因组DNA。此时，可选择HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (R223-01)，以彻底消除基因组DNA的背景。
- 逆转录反应的快速程序适合于大多数RT-qPCR实验。一般情况下，结果与标准程序没有显著可见的差异。如果使用快速程序，发现目的基因的扩增效率较差，或者Ct值过大，则改用标准程序，以提高cDNA的产量。