

# HiScript® II One Step RT-PCR Kit (Dye Plus)

P612-01

Version 7.1



Vazyme biotech co., Ltd.

## 产品简介

HiScript® II One Step RT-PCR Kit (Dye Plus)专为以RNA为模板 (如RNA病毒)的终点法PCR检测而设计, PCR产物可直接加样电泳, 大大节省了操作人工耗时。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, 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™ plus DNA Polymerase的优越性能, 配合经过优化的缓冲体系, HiScript® II One Step RT-PCR Kit (Dye Plus)的检测灵敏度可达到1 pg总RNA, 并可扩增长达10 kb的片段。试剂盒以便捷的Master Mix形式提供。2 × One Step Mix (Dye Plus)包含优化的缓冲体系、dNTP以及加样染料; One Step Enzyme Mix包含比例优化的HiScript® II Reverse Transcriptase、RNase inhibitor以及Champagne Taq™ plus DNA Polymerase。

## 产品组成

组 分	P612-01 50 rxn (50 µl/rxn)
RNase free ddH <sub>2</sub> O	2 × 1 ml
2 × One Step Mix (Dye Plus) <sup>a</sup>	2 × 625 µl
One Step Enzyme Mix <sup>b</sup>	125 µl

a. 包含dNTP、甘油及染料

b. 包含RNase inhibitor

## 储存条件

-20°C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1: 以1 µg HeLa cell total RNA为模板, 扩增FBN1基因。琼脂糖凝胶电泳, EB染色, 可见10 kb目的条带。

功能检测2: 以1 pg HeLa cell total RNA为模板, 扩增GAPDH基因。琼脂糖凝胶电泳, EB染色, 可见有单一的550 bp条带。

## 注意事项

- 防止RNase污染, 请保持实验区域洁净; 操作时需要戴干净的手套、口罩; 实验所用的离心管、枪头等耗材均需RNase-free级别。
- 退火温度需要根据引物退火温度调整, 一般设置成低于引物退火温度1-2°C即可。对于> 5kb的片段, 推荐使用长引物, T<sub>m</sub>值在68-70°C, 把退火/延伸温度合并为68°C。这样可以显著提高扩增特异性。详见应用实例。
- 对于< 5 kb的片段, 延伸时间最少设置为0.5 min/kb; 对于> 5 kb的片段, 延伸时间最少设置为1 min/kb。一般来说, 延伸时间的延长有利于提高扩增产量。详见应用实例。

## 应用实例

### 1. 在RNase-free离心管中配制如下混合液

RNase free ddH <sub>2</sub> O	to 50 µl
2 × One Step Mix (Dye Plus)	25 µl
One Step Enzyme Mix	2.5 µl
Gene Specific Primer Forward (10 µM)	2 µl
Gene Specific Primer Reverse (10 µM)	2 µl
模板RNA	Total RNA: 1 pg-1 µg

注：可根据实验需要，调整反应体积，各组分用量只需按比例做相应调整即可。

### 2. 按下列条件进行One Step RT-PCR反应

目的片段 < 5 kb

50°C <sup>a</sup>	30 min	
94°C	3 min	
94°C	30 sec	} 30-35 cycles
55°C~72°C <sup>b</sup>	30 sec	
72°C	0.5-1 min/kb <sup>c</sup>	
72°C	7 min	
4°C	Hold	

目的片段 > 5 kb

50°C <sup>a</sup>	30 min	
94°C	3 min	
94°C	30 sec	} 30-35 cycles
68°C <sup>b</sup>	1 min/kb <sup>c</sup>	
72°C	7 min	
4°C	Hold	

a. 如果需扩增基因的RNA模板具有复杂二级结构或高GC区域，可将逆转录步骤反应温度提高至55°C，有助于提高产量。

b. 退火温度需要根据引物退火温度调整，一般设置成低于引物退火温度1-2°C即可。对于 > 5 kb的片段，推荐使用长引物，T<sub>m</sub>值在68-70°C，把退火/延伸温度合并为68°C。这样可以显著提高扩增特异性。

c. 对于 < 5 kb的片段，延伸时间最少设置为0.5 min/kb；对于 > 5 kb的片段，延伸时间最少设置为1 min/kb。一般来说，延伸时间的延长有利于提高扩增产量。

### 3. 产物直接用琼脂糖凝胶电泳检测。