

HiScript® II U⁺ One Step qRT-PCR Probe Kit

Q223

Version 22.1



产品概述

HiScript II U⁺ 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。使用基因特异性引物(GSP)，逆转录和qPCR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。本试剂盒中引入了dUTP/UDG防污染系统。热敏感(Heat-labile)UDG在室温下即可将含U的污染物迅速降解；55℃逆转录时，Heat-labile UDG迅速失活，不会影响RT-qPCR的效率和灵敏度。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 U⁺ One Step qRT-PCR Probe Kit的检测灵敏度可达到0.1 pg总RNA或<10拷贝的RNA模板。试剂盒以便捷的Master Mix形式提供。2 × One-Step U⁺ Mix包含优化的缓冲体系和dNTP/dUTP Mix，适用于TaqMan等荧光标记探针的高特异性检测系统。

产品组分

| 组分 | Q223-01 250 rxns (20 µl/rxn) |
|---|------------------------------|
| <input type="checkbox"/> RNase-free ddH ₂ O | 2 × 1.25 ml |
| <input checked="" type="checkbox"/> 2 × One Step U ⁺ Mix ^a | 2 × 1.25 ml |
| <input checked="" type="checkbox"/> One Step U ⁺ 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/dUTP Mix, Mg²⁺。

b. 包含HiScript II Reverse Transcriptase、RNase inhibitor、Heat-labile UDG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。

保存条件

-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。

适用范围

本产品广泛用于动物、植物、微生物(病毒等)的各种RNA类核酸检测。

注意事项

- One Step U⁺ 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。
- 反应液的配制请使用RNase-free枪头，EP管等，尽量避免污染。

实验流程(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 U ⁺ Mix | 10 µl | ■ |
| One Step U ⁺ Enzyme Mix | 1 µl | ■ |
| 50 × ROX Reference Dye 1 | 0.4 µl | |
| Gene Specific Primer Forward (10 µM) | 0.4 µl | |
| Gene Specific Primer Reverse (10 µM) | 0.4 µl | |
| TaqMan Probe (10 µM) | 0.2 µl | |
| 模板RNA | Total RNA: 1 pg - 1 µg | |

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整:

- ▲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。
- ▲探针终浓度可以在50 - 250 nM之间调整。
- ▲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。
- ▲扩增产物长度请选择在80 - 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 | Rep:1 | 55°C ^a | 15 min |
| Stage 2 | 预变性 | Rep:1 | 95°C | 30 sec |
| Stage 3 | 循环反应 | Reps: 45 | 95°C | 10 sec |
| | | | 60°C | 30 sec ^b |

快速程序 (可满足大部分应用)

| | | | | |
|---------|------|----------|-------------------|---------------------|
| Stage 1 | 逆转录 | Rep:1 | 55°C ^a | 5 min |
| Stage 2 | 预变性 | Rep:1 | 95°C | 30 sec |
| Stage 3 | 循环反应 | Reps: 45 | 95°C | 5 sec |
| | | | 60°C | 20 sec ^c |

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.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 sec;使用ABI 7000和7300时至少31 sec;使用ABI 7500时至少34 sec。

c.实际使用的Real Time PCR仪是否支持快速扩增循环,初次尝试请进行预实验确认。

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。

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。