



产品描述

HiPro™ One Step qRT-PCR Kit 是专为一歩法荧光定量反转录 PCR 实验配制的。采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂，使用该试剂盒能够方便快捷的在同一个反应管内进行 Real Time qRT-PCR 反应。反应过程中无需打开管盖添加试剂并可对扩增产物进行实时检测，避免了污染的同时提高了检测灵敏度和实验效率。非常适合于微量 RNA 尤其是微量 RNA 病毒的检测。本试剂盒包括最佳配比优化的 HiPro™ OneStep Enzyme Mix(包含突变改造 HiPro™ Reverse Transcriptase、HotPro™ Taq DNA Polymerase 和 RNainor RNA 酶抑制剂 mix)，同时包含适用于反转录和荧光 PCR 扩增的独特 2 XqRT-PCR Mix 反应体系。本酶 M-MuLV(RNase H⁻)的 RNase H 活性缺失，与 M-MuLV 相比，具有更强的延伸能力和稳定性。同时该酶提高了耐热性，可以在 42-50°C 反转录，提高了复杂二级结构，GC 含量丰富模板反转录效率。而采用优质热启动酶 HotPro™ Taq DNA Polymerase 可以最大限度的减少 PCR 扩增全程中的非特异性扩增产物产生，大大提高了荧光定量 PCR 反应的精确性。本制品可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。

产品应用

用于高拷贝、低拷贝基因检测；部分高 GC 含量或具有复杂二级结构的 RNA 模板。

产品组成

| 组份 | PC911-01 125rxn(20μ l/rxn) | PC911-02 250rxn(20μ l/rxn) |
|---|----------------------------|----------------------------|
| 2 × qRT-PCR Mix (Contains SYBR Green I) | 1.25 ml | |
| HiPro™ One Step Enzyme Mix | 100 μl | |
| RNase free H ₂ O | 1.5 ml | PC911-01×2 |

产品储存

-20°C保存。

注意事项

1. 当同时需要进行数次 Real Time One Step qRT-PCR 反应时，应先配制各种试剂的混合液 (Master Mix，其中包括 RNase-free ddH₂O、Buffer、各种酶等)，然后再分装到每个反应管中。这样可使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失，避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作或实验样品之间产生的误差。
2. 使用 HiPro™ One Step Enzyme Mix 时，分取之前要小心地瞬间离心收集到反应管底部；由于酶保存液中含有高浓度的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。
3. 2 × qRT-PCR Mix 内含 SYBR Green I，保存或配制 One Step qRT-PCR 反应液时应避免强光照射。
4. 本制品不含 Rox Reference Dye，部分需要用 Rox 染料校准孔间差异的荧光定量 PCR 仪器可另外选购 Rox Reference Dye (货号 PC914)。
5. 为保证反应成功建议使用高质量的 RNA 模板。
6. 不同的片段，所需最佳 RNA 模板用量不同，过多的 RNA 会抑制反应，建议根据反应调整模板用量。
7. 只能使用特异性引物，不能使用 Oligo(dT) 和 Random Primer 进行反应。



应用实例

建议反应体系 (20 μ l) : 【注意：2 \times qRT-PCR Mix 使用前充分融解颠倒混匀 (避免剧烈涡旋产生大量气泡)。短期频繁使用可放 4 $^{\circ}$ C 冰箱。】

根据下表冰上配制反应液：

| | |
|-------------------------------|----------------|
| RNase free ddH ₂ O | to 20 μ l |
| 2 \times qRT-PCR Mix | 10 μ l |
| Forward Primer (10 μ m) | 0.4 μ l |
| Reverse Primer (10 μ m) | 0.4 μ l |
| HiPro™ One Step Enzyme Mix | 0.8 μ l |
| RNA template | 1 pg-1 μ g |

注意：引物浓度请以终浓度 0.2-0.6 μ M 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。

如果同时进行多个反应，先按比例配成混合液，振荡混匀后，按每管 20-X μ l (X 为模板量)分装。

Real Time PCR 扩增

1. 将配制好的反应体系混匀、离心后。
2. 将热循环仪预热到 42 $^{\circ}$ C，将 PCR 管置于热循环仪中，按以下反应条件进行反应。

扩增程序：

| | | | |
|--------------------|-----------|----------------|--|
| 42 $^{\circ}$ C | 20-30 min | 1 | |
| 94 $^{\circ}$ C | 2-3 min | 1 | |
| 94 $^{\circ}$ C | 20 sec | } 30-40 cycles | |
| 50-60 $^{\circ}$ C | 20 sec | | |
| 72 $^{\circ}$ C | 20 sec | | |

根据需要加入融链曲线分析

注意：如果所采用的荧光定量 PCR 仪器没有特殊的要求，建议采用上述图表显示的标准的三步法 PCR 反应程序，如果使用该程序得不到良好的实验结果时，再进行 PCR 条件的优化，例如采用两步法进行扩增可以减少非特异扩增，增强扩增的特异性。

3. 实验结果分析。反应结束后确认 One Step qRT-PCR 的扩增曲线和融解曲线，进行 qRT-PCR 定量时制作标准曲线等。