

HotScript Plus SYBR Green Two-Step qRT-PCR Kit (OneStep gDNA Removal)

使用说明书

版本号: 240220

产品组成:

Components	QP104-01 (100次*20uL/125次*20uL)
5× HotScript Reaction Mix	400μL
gDNA Remover	100μL
Oligo(dT)(0.5μg/μL)	100μL
Random primer(N6)	100μL
AipMix 2× SYBR Green qPCR SuperMix(Universal ROX)	1.25mL
RNase-free Water	1.5mL

产品储存: 2-8°C运输, -20°C避光保存, 保质期 24 个月。使用前充分融解混匀, 短期使用可放在 4°C存放 2 周。

适用范围: 可用于高拷贝、低拷贝基因的检测。部分高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板。

制品说明:

本试剂盒是具有高效合成效率和高扩增效率的两步法荧光定量 PCR 试剂盒。

反转录试剂以 RNA 为模板, 采用预混合技术, 用 5× HotScript Reaction Mix(已经预混合了 HotScript H⁻ RTase、RNase Inhibitor、dNTP Mixture、Buffer)快速高效合成第一链 cDNA, 操作简单便捷。采用分子进化技术高达 60°C 的全新高温反转录酶, 可以通读 GC 含量丰富或二级结构复杂的 RNA 模板, 极大提高反转录效率和长度, 可用于更长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建等。本试剂盒中使用了具有 DNA 分解活性的特殊 gDNA Remover, 只需一步操作, 即可同时完成基因组清除与逆转录反应, 极大的简化了实验操作步骤, 避免了复杂加样过程中造成的污染与 RNA 降解的风险。反转录试剂包含合成高质量第一链 cDNA 所需的所有成分, 反转录合成的 cDNA 产物适用于后续的 PCR/qPCR 等实验。用户可根据需要, 选择 Oligo (dT)、Random 或基因特异引物作为反转录引物。后续灵活可选的操作步骤, 既可合成用于克隆的全长 cDNA (可达 20 kb), 又可高效合成用于 qPCR 的各个位置反转录效率均一的

cDNA。

qPCR 试剂是采用 SYBR® Green I 嵌合荧光法进行 Real-Time PCR 的专用预混型试剂。已经将热启动 HotMaster Taq DNA 聚合酶、dNTP、特殊稳定剂、优化的反应缓冲液、BSA 和 SYBR® Green I 等试剂预混成一种适合 Real-Time PCR 反应检测用 2× Premix Type 试剂，具有灵敏度高、特异性强、稳定性好等特点。使用时只需加入模板、引物和水，便可在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对目的基因进行准确定量检测，重复性好，可信度高。采用全新的 Hotmaster Taq DNA 聚合酶，该酶不同于一般 Hot-start 酶之处在于，一般的 Hot-start 酶只在第一步温度升高之前封闭酶的活性，而 Hotmaster Taq DNA 聚合酶是利用抑制剂通过温度调节方式封闭 Hotmaster Taq DNA 聚合酶的底物结合位点，温度低于 40°C 时，形成非活性的酶-抑制剂复合物，当温度升高至引物特异性的退火温度时，结合平衡向模板-特异性引物复合物形成方向移动，因此最大限度的减少 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。

qPCR 试剂已加入特殊的通用 ROX 参比染料，具有高通用性，适用于所有型号的 qPCR 仪器，无需在另外添加 ROX，也无需在不同的仪器上调整 ROX 的使用浓度，操作更简单更便捷，即可快速高效的进行 qPCR 扩增。ROX 主要用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差。

产品特点：

1. 反转录试剂采用新一代高温反转录酶，极大提高了包括复杂 RNA 模板的反转录效率和长度，合成 cDNA 长度高达 15kb 以上。采用全预混的反转录 Mix，并配备了先进的 gDNA Remover 一步法基因组清除技术，只需一步同时加入 gDNA Remover、模板 RNA、引物和水，实现 cDNA 合成和去除基因组 DNA 同时进行，最快 15 分钟即可简单快速完成反转录实验。反转录预混合 Mix 在 -20°C 不冻结，减少了化冻和混匀时间，使用更简单、更便捷。RNA 模板的体积最多可加到总体积的 75%，非常适合于低浓度 RNA 模板的逆转录。用户可根据需要，灵活选择 Oligo(dT)、Random primer 或基因特异引物作为逆转录引物。
2. qPCR 试剂为全预混 Mix，采用进口原料和特殊工艺批量生产，质量超稳定，批间差极小，扩增效率强，特异性高，灵敏度高，数据准确。

第一链 cDNA 合成的引物选择：

1. 如果模板为真核生物来源，一般情况下首选 Oligo(dT)，与真核生物 mRNA 的 3' Poly A 尾配对，可获得最高产量的全长 cDNA。
2. 如果对一些物种，不能确定 mRNA 是否有 poly A 尾的情况下，首选 Oligo(dT)，不成

功再尝试基因特异性引物(GSP)和Random primer为引物。

3. 基因特异性引物(GSP)的特异性最高。但有些情况下,用于PCR反应的GSP无法有效引导第一链cDNA合成,可改用Oligo(dT)或Random primer重新进行逆转录。
4. Random primer特异性最低,所有RNA,包括mRNA、rRNA、tRNA均可以作为Random primer的模板。当目标区域具有复杂二级结构或GC含量较高,或者模板为原核生物来源,使用Oligo(dT)或基因特异性引物(GSP)无法有效引导cDNA合成时,可使用Random primer为引物。
5. 如果合成cDNA下游用于荧光定量PCR,可将Oligo(dT)与Random primer混合使用(各加1 μ L/20 μ L反应体系),可使mRNA的各个区域cDNA合成效率相同,有助于提高定量结果的真实性和重复性。

第一链cDNA合成: (以20 μ L反应体系为例)

1. 加入以下成分(使用前将各溶液轻弹或轻微涡旋混匀,可短暂离心以收集残留在管壁的液体到管底)

Components	Volume(20 μ L)
Total RNA/mRNA	50ng-5 μ g/5-500ng
Oligo(dT)(0.5 μ g/ μ L) or Random Primer(0.1 μ g/ μ L) or GSP(Gene Specific Primer, 2pmol/ μ L)	1 μ L
5 \times HotScript Reaction Mix	4 μ L
gDNA Remover	1 μ L
RNase-free Water	To 20 μ L

注: 如果反转录时不需要去基因组DNA,直接略去gDNA Remover成分不加即可。

注: gDNA Remover每次按照0.8 μ L-0.9 μ L使用,也不影响使用效果。

注: 5 \times HotScript Reaction Mix和gDNA Remover含甘油非常粘稠,溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失,用前请点甩离心后使用,并且避免吸头外壁沾附损失。5 \times HotScript Reaction Mix内包含的酶均为过量,即使每次按照3.6 μ L-3.8 μ L使用,也不影响使用效果。

2. 轻轻混匀

注: 如用Oligo(dT)或基因特异引物(GSP),50 $^{\circ}$ C孵育30-50 min(如产物用于qPCR,50 $^{\circ}$ C孵育15 min);如用Random Primer,25 $^{\circ}$ C孵育10 min,50 $^{\circ}$ C孵育30-50 min(如产物用于qPCR,50 $^{\circ}$ C孵育15 min)。

注: 本制品在42 $^{\circ}$ C-60 $^{\circ}$ C反转录均有稳定良好效果。如果模板具有复杂二级结构或高GC区域,可尝试将反应温度提高至55 $^{\circ}$ C-60 $^{\circ}$ C,有助于提高产量。

3. 85 $^{\circ}$ C加热5 sec失活HotScript H⁻ RTase。

4. 得到的cDNA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-70°C保存。cDNA应避免反复冻融。

■ **RT-PCR:** 建议取1/10-1/5体积(2-4μL)的反转录产物作为PCR模板；丰度高的可以酌情适当稀释cDNA后使用。

■ **建议PCR条件:** 请按照选择的爱普科学或其它厂家的PCR试剂说明书进行。

■ **建议爱普科学配套PCR试剂:**

常规扩增: GP112-AipMix 2× Taq PCR MasterMix(+Dye)或GP121-AipMix 2× HiFi QuickLong PCR MasterMix(+Dye)

高保真扩增: GP122-AipMix 2× HiFi FastShort PCR MasterMix (+Dye) 或 GP123-AipMix 2× HiFi FastLong PCR MasterMix (+Dye)

建议PCR条件: (以20μL和50μL反应体系为例，反应液配制请在冰上进行)

Components	Volume(20μL)	Volume(50μL)	Final Concentration
2× SYBR Green qPCR Mix (Universal ROX)	10μL	25μL	1×
DNA Template	2μL	4μL	as required
Forward Primer (10μM)	0.4μL	1μL	0.2μM each
Reverse Primer (10μM)	0.4μL	1μL	0.2μM each
ddH ₂ O to final volume	20μL	50μL	Not applicable

PCR 循环(二步法):

95°C: 2 min

95°C: 15 sec

60°C: 30-34 sec



40 cycles

Dissociation Stage

PCR 循环(三步法):

95°C: 2 min

95°C: 15 sec

60°C: 15-20 sec

72°C: 20-30 sec



40 cycles

Dissociation Stage

说明: 本制品兼容性强，适用于不同厂家、型号的荧光定量PCR仪，绝大多数情况下使用二步法和三步法均可获得良好效果。在实际使用中可以根据机型推荐和具体情况对程序加以微调。一般来说，二步法扩增特异性高，三步法扩增效率高。如果融链曲线较差，可以尝试两步法扩增；若因使用T_m值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试加长延伸时间或者进行三步法PCR扩增。

注意事项:

1. 操作中注意避免RNase污染，为保证反转录成功，建议使用高质量的RNA模板。
2. **可选步骤(一般不需要):** 如果RNA模板GC含量丰富或者有复杂二级结构、或者扩增

cDNA长度超过3kb，可以先只加RNA模板、引物和RNase-free Water混匀，65°C变性5分钟，冰上冷却，短暂离心后加入其它成分继续下面的反转录步骤。

3. qPCR试剂在使用前请轻柔的上下颠倒混匀后进行使用，也可将预混合试剂经短暂离心后混匀进行使用。请勿漩涡振荡混匀，避免产生过量气泡，影响定量结果。
4. qPCR试剂含SYBR® Green I 强光下易分解和降低敏感度，保存和使用时应避免长时间强光照射。建议在冰上配制PCR反应液，再放入PCR仪器中扩增，可以提高扩增特异性，减少背景。
5. qPCR试剂含有4mM MgCl₂(反应体系终浓度是2mM Mg²⁺)，可用25mM MgCl₂优化Mg²⁺浓度。

=====



扫码关注我们