

HiScript® Q Select RT SuperMix for qPCR

R132-01

Version 7.1



Vazyme biotech co., ltd.

产品概述

HiScript® Reverse Transcriptase是在M-MLV (H-) Reverse Transcriptase基础上经过多点突变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® Q Select RT SuperMix for qPCR适用于两步法qRT-PCR检测，5 × Select qRT SuperMix 中含有Buffer、dNTP Mix、HiScript Reverse Transcriptase以及RNase inhibitor，可根据需要，选择Oligo dT、Random primers或基因特异引物作为逆转录引物。5 × Mix 在-20°C不会冻结，加入模板RNA和引物即可迅速进行反应。

逆转录产物兼容SYBR® Green和探针法qPCR，可以根据实验目的，可选择相应的试剂配合使用，进行高性能的基因表达分析。

产品组分

组 分	R132-01 100 rxn (20 µl/rxn)
RNase free ddH ₂ O	2 × 1 ml
5 × Select qRT SuperMix ^a	400 µl
Oligo (dT) ₁₈ (10 µM)	100 µl
Random hexamers (50 ng/µl)	100 µl
5 × Select No RT Control Mix ^b	40 µl

a. 包含Buffer、dNTP Mix、HiScript Reverse Transcriptase、RNase inhibitor。

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

保存条件

-20°C保存。

质量控制

所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶及RNase残留。

功能检测：以1 pg-1 µg HeLa 细胞总RNA为模板，qRT-PCR检测高中低三种丰度共四个基因表达。以4-6个数量级的模板量的对数值对C_t值做标准曲线并计算扩增效率，R²>0.990，扩增效率在0.9到1.1之间。

实验准备和指南

自备材料

RNase-free 1.5 ml离心管、0.2 ml PCR管、移液器吸头
移液器；PCR仪；冰或移动冰盒

RNA

高质量的完整的RNA对于获得高质量的cDNA是至关重要的。实验前请验证RNA的完整性。

qPCR指南

第一链cDNA产物可直接用作qPCR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 (Vazyme #Q111)、AceQ® qPCR Probe Master Mix (Vazyme #Q112) 或ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix (Vazyme #Q311) 作为qPCR试剂。

实验流程

1. 在RNase-free离心管中配制如下混合液

RNase free ddH ₂ O	to 20 μ l
5 \times Select qRT SuperMix	4 μ l
Oligo (dT) ₁₈ (10 μ M)	
or Random hexamers (50 ng/ μ l)	1 μ l
or Gene specific primers (2 μ M)	
模板RNA	Total RNA: 1 pg-1 μ g

用移液器轻轻吹打混匀。

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 20 μ l
5 \times Select No RT Control Mix	4 μ l
Oligo (dT) ₁₈ (10 μ M)	
or Random hexamers (50 ng/ μ l)	1 μ l
or Gene specific primers (2 μ M)	
模板RNA	Total RNA: 1 pg-1 μ g

用移液器轻轻吹打混匀。

2. 进行逆转录反应

50 $^{\circ}$ C*	15 min
85 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C，有助于提高产量。

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

注意事项

- 5 \times Select qRT SuperMix 及5 \times Select 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，并用移液枪轻轻反复吸打充分混匀后，准确吸取。
- 20 μ l逆转录反应体系建议加入不超过1 μ g的Total RNA。如果目的基因表达量非常低，最多加入5 μ g 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。
- 如果加入RNA模板体积较大(如超过2 μ l)，请确保RNA是溶于水中而不是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C_T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 Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (Vazyme #R133-01)，以彻底消除基因组DNA的背景。
- cDNA产物仅适用于qPCR反应，不适用于克隆等下游实验的长片段PCR扩增。如有需要，可使用HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Vazyme #R111)进行操作。



企业已通过ISO 9001:2015
国际质量管理体系认证