

# HiScript® II One Step RT-PCR Kit

P611-01

Version 9.2



Vazyme biotech co., ltd.

## 产品概述

HiScript® II One Step RT-PCR Kit专为以RNA为模板(如RNA病毒)的终点法PCR检测而设计。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, 大大提高了检测通量, 并降低了污染的风险。整合HiScript® II Reverse Transcriptase以及专为长片段扩增设计的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可扩增片段长达10 kb以上。试剂盒以便捷的Master Mix形式提供。2 × One Step Mix包含优化的缓冲体系和dNTP; One Step Enzyme Mix包含比例优化的HiScript® II Reverse Transcriptase、RNase inhibitor以及Champagne Taq plus DNA Polymerase。

## 产品组分

组 分	P611-01 50 rxn (50 µl/rxn)
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	2 × 1 ml
2 × One Step Mix <sup>a</sup>	2 × 625 µl
One Step Enzyme Mix <sup>b</sup>	125 µl
10 × Loading buffer	1.25 ml

a. 包含dNTP。

b. 包含RNase inhibitor、HiScript II Reverse Transcriptase、以及Champagne Taq plus DNA Polymerase。

## 保存条件

-30 ~ -15°C保存。-20 ~ 0°C运输。

## 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细胞总RNA为模板, 扩增*FIB*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细胞总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、枪头等耗材均需保证RNase-free。

## 实验流程

### 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	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, 各组分用量只需等比例做相应调整即可。

\* RNA模板变性有助于打开二级结构, 可在很大程度上提高第一链cDNA的产量。对于长度超过5 kb的cDNA片段, 请在上述步骤前对RNA模板单独进行变性处理: 65°C加热5 min, 迅速置于冰上骤冷, 并在冰上静置2 min后作为模板配制反应体系。

## 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	5 min		
4°C	Hold		

目的片段>5 kb

50°C <sup>a</sup>	30 min		
94°C	3 min		
94°C	10 sec	}	30 - 35 cycles
68°C <sup>b</sup>	1 min/kb <sup>c</sup>		
72°C	5 min		
4°C	Hold		

a. 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°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，Tm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20 sec/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. 产物用琼脂糖凝胶电泳检测



ISO 9001: 2015