

Hifair® III One Step RT-qPCR SYBR Green Kit

产品简介

Hifair® III One Step RT-qPCR SYBR Green Kit 是以 RNA 为模板进行定量 PCR 反应的试剂盒。在实验的过程中，逆转录和定量 PCR 在同一反应管中进行，简化了实验操作，降低了污染的风险。本试剂盒以 RNA 为模板，使用基因特异性引物，利用耐热 Hifair® III Reverse Transcriptase 高效合成第一链 cDNA，并以此为模板在 UNICON® HotStart Taq DNA Polymerase 作用下，配合优化的缓冲体系能够特异灵敏的对 RNA 模板进行精确定量。同时 Buffer 中额外添加了有效抑制非特异性 PCR 扩增的组分和提高扩增能力的促进因子，使定量 PCR 结果可以在宽广范围内更加真实有效。

本试剂盒以 Kit 形式提供，2×Hifair® III SG buffer 包含优化的缓冲体系和 dNTPs 等，优化了有效抑制非特异性 PCR 扩增的因子和提升 PCR 反应扩增效率的因子，适用于 SYBR Green 标记的高特异性检测系统。此外，Hifair® UH III Enzymes 包含比例优化的 Hifair® III Reverse Transcriptase、RNase inhibitor 及 UNICON® HotStart Taq DNA Polymerase 等。

产品信息

货号	11143ES50 / 11143ES70 / 11143ES80
规格	50 T / 200 T / 500 T

组分信息

组分编号	组分名称	11143ES50	11143ES70	11143ES80
11143-A	2×Hifair® III SG buffer*	500 µL	4×500 µL	5 mL
11143-B	Hifair® UH III Enzymes	50 µL	200 µL	500 µL
11143-C	Hieff® 50×High Rox	50 µL	200 µL	500 µL
11143-D	Hieff® 50×Low Rox	50 µL	200 µL	500 µL
11143-E	RNase-free ddH ₂ O	500 µL	4×500 µL	5 mL

*SG buffer 为 SYBR Green buffer 的简写，UH 为 UNICON-Hifair 的简写。

储存条件

-25~-15°C避光储存，有效期 1 年。本品避免反复冻融。建议分装保存。

使用说明

组分	体积 (µL)	终浓度
2×Hifair® III SG buffer	10	1×
Hifair® UH III Enzymes	1	-
Hieff® 50×High Rox or Low Rox ^b	0.4	1×
Forward Primer (10 µmol/L)	0.4	0.2 µmol/L ^a
Reverse Primer (10 µmol/L)	0.4	0.2 µmol/L ^a
模板 RNA ^c	Total RNA 1 pg-1 µg	-
RNase-free ddH ₂ O	to 20 ^d	-

表 1 反应体系(以 20 µL 为例)**

**使用前务必充分混匀，避免剧烈震荡产生过多气泡。

- a. 引物浓度：通常引物终浓度为 0.2 μmol/L，也可以根据情况在 0.1-1.0 μmol/L 之间进行调整。
- b. 参比染料：Rox 的添加，可根据不同仪器型号进行选择，具体可参考【适用机型】。
- c. 模板稀释：qPCR 灵敏度极高，建议将模板进行稀释使用，控制 CT 值在 20-30 之间适宜。
- d. 反应体系：推荐使用 20 μL 或 50 μL，以保证目的基因扩增的有效性和重复性。
- e. 体系配制：请于超净工作台内配制，并使用无核酸酶残留的枪头、反应管；推荐使用带滤芯的枪头。避免交叉污染和气溶胶污染。

循环步骤	温度	时间	循环数
逆转录	42°C ^b	10 min ^a	1
预变性	95°C	5 min	1
扩增反应	95°C	10 sec	40
	60°C	30 sec	
熔解曲线 ^d	仪器默认设置		1

表 2 标准扩增程序***

***针对实验需求可做适当调整。

- a. 逆转录：对于一些极低丰度的基因可以将逆转录时间适当延长至 15 min。
- b. 温度：对于含复杂二级结构或高 GC 含量的 RNA 模板，可将逆转录温度提高到 55°C，有助于提升灵敏度。
- c. 荧光信号采集：不同的 qPCR 检测仪器所需的荧光信号采集时间不同，请根据最短时间限制进行设置。
- d. 熔解曲线：通常情况下可以使用仪器默认程序。

适用机型

High Rox 适用机型：ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT Fast, StepOne, StepOne Plus;

Low Rox 适用机型：ABI 7500, 7500 Fast, ViiA7, QuantStudio 3 and 5, QuantStudio 6, 7, 12k Flex;

Stratagene MX3000P, MX3005P, MX4000P;

不需要 Rox 校正的仪器型号：

Bio-Rad: CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ5, MyiQ, MiniOpticon, Opticon, Opticon 2, Chromo4;

Eppendorf: Mastercycler ep realplex, realplex 2 s;

Qiagen: Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000;

Roche Applied Science: LightCycler 480, LightCycler2.0, Lightcycler 96;

Thermo Scientific: PikoReal Cyclus; Cepheid: SmartCycler; Illumina: Eco qPCR.

注意事项

1. 实验过程中请使用 RNase-free 耗材。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
3. 本产品仅作科研用途！