

目录号:P314

Script III One Step RT-PCR Kit

产品内容

Components	P314-100	P314-500
	100 rxns (20 μ l/rxn)	500 rxns (20 μ l/rxn)
One Step Enzyme Mix	100 μ l	500 μ l
2x RT-PCR Buffer	1.3 ml	1.3 ml x5
RNase-free H ₂ O	2x 1 ml	1ml x10

保存条件

-20°C保存, 有效期 12 个月。使用前, 充分融解, 轻轻颠倒混。

产品简介

本试剂盒是专为一步法RT-PCR实验研制, 逆转录和PCR在同一个反应管内完成, 反应过程中无需打开管盖添加试剂, 避免了污染的同时提高了检测灵敏度和实验效率。本试剂盒包括全新高效逆转录酶, 热启动Taq DNA聚合酶, 同时包含适用于逆转录和PCR扩增的独特反应Buffer。本Super RT逆转录酶的RNase H活性缺失, 具有更强的延伸能力和稳定性, 可用于较长的cDNA合成以及高比例的全长cDNA文库的构建等。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。

操作步骤:

- 将RNA模板、引物、2x RT-PCR Buffer、One Step Enzyme Mix、RNase-Free H₂O溶解并置于冰上备用。
- 冰上配制RT-PCR反应体系: (以20 μ l反应体系为例)

Components	Volume (20 μ l)	Final Concentration
2× RT-PCR Buffer	10 μ l	1×
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.25 μ M each
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.25 μ M each
One Step Enzyme Mix	1 μ l	-
RNA Template	X μ l	1pg - 1 μ g
RNase free H ₂ O	Up to 20 μ l	Not applicable

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。

3. 涡旋震荡混匀, 短暂离心,, 使管壁上的溶液收集到管底。

4. 预热PCR到50°C, 将PCR管置于PCR仪中, 按以下反应条件进行反应。

反转录	50°C	30 min
PCR预变性	94°C	2 min
变性	94°C	30 sec
退火	55 ~ 60°C	30 sec
延伸	72°C	30~60 sec
终延伸	72°C	5 min

注意:

- 1) 一般PCR实验中退火温度比扩增引物的溶解温度Tm低5°C, 退火时间一般为20 ~ 30 sec, 无法得到理想的扩增效率时, 适当降低退火温度; 发生非特异性扩增时, 提高退火温度, 由此优化反应条件
- 2) 延伸时间根据所扩增的片段大小设定, 本产中的Taq酶的扩增效率为1kb/min。
- 3) 可根据扩增产物的下游应用设定循环数。循环次数太少, 扩增量不足; 循环次数多, 错配机率会增加, 非特异性背景严重。所以, 在保证产物得率的前提下, 应尽量减少循环次数。
- 4) 不能使用Oligo(dT) 和Random Primer 合成cDNA。
- 5) 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。

相关产品:

R011-100	RNAzol Reagent (Trizol)	
R013-50	通用型总RNA快速提取试剂盒 (TRIzol+吸附柱)	免氯仿, 升级版
R017-50	动物组织/细胞/昆虫总RNA快速提取试剂盒	免氯仿, 同RNeasy Mini Kit
R218-50	动物组织/细胞/昆虫总RNA快速提取试剂盒(带gDNA过滤器)	免氯仿, 同RNeasy Plus Mini Kit
R019-50	植物总RNA提取试剂盒	免氯仿, 同RNeasy Plant Mini Kit
R318-50	多糖多酚植物总RNA快速提取试剂盒(带gDNA过滤器)	免氯仿
R513-50	果实/种子总RNA快速提取试剂盒(带gDNA过滤器)	难题样本: 果实、种子、中草药等