

目录号:P415

Script IV One Step RT-PCR Kit**产品内容**

Components	P415-100 100 rxns (20 µl/rxn)	P415-500 500 rxns (20 µl/rxn)
One Step Enzyme Mix	100 µl	500 µl
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℃保存，有效期 12 个月。

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 IV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℃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：

1. 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。
2. 冰上配制RT-PCR反应体系：（以20µl反应体系为例）

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

注意：引物浓度请以终浓度0.2-0.6µM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-Xµl (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	} 30 ~ 40 cycles
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 T_m 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