

One Step SuperRT-PCR Mix Kit

货号: AC17187

规格: 50T/200T (25 μ L 体系为例)

保存: -20 $^{\circ}$ C 保存长期保存, 使用前应混匀, 避免反复冻融。

产品内容:

1. 5 \times SuperRT OneStep Buffer
2. Enzyme Mix

产品介绍:

本试剂是用于一步法 RT-PCR 实验中, 逆转录和 PCR 在同一反应体系中进行, 反应过程中无需添加试剂, 无需打开管盖, 在避免污染的同时提高了检测灵敏度和实验效率。本试剂中包括高效逆转录酶、新型热启动 DNA 聚合酶, 同时包含适用于逆转录和 PCR 扩增的反应缓冲液。高效逆转录酶 RNase H 活性缺失, 减少了逆转录反应中 RNA 的降解。该逆转录酶逆转录效率高, 可对少量 RNA 模板进行良好的逆转录反应。PCR 反应使用的快速热启动 DNA 聚合酶具有扩增效率高、特异性强的优良性能。独特的缓冲体系使逆转录酶和聚合酶同时发挥最大功效。使用本试剂扩增得到的目的产物 3'端附有一个“A”碱基, 可直接用于 T/A 克隆。

使用方法:

1. 将 RNA 模板、引物、5 \times SuperRT OneStep Buffer、Enzyme Mix 和 RNase-Free Water 溶解并置于冰上备用。
2. 根据以下表格配制反应体系:

试剂	25 μ L 体系	50 μ L 体系	终浓度
5 \times SuperRT One Step Buffer	5 μ L	10 μ L	1 \times
Primer 1 10uM	0.5~1 μ L	1~2 μ L	0.2~0.4 μ M
Primer 2 10uM	0.5~1 μ L	1~2 μ L	0.2~0.4 μ M
Enzyme Mix	1.5 μ L	3 μ L	
RNA Template	0.5-2 μ L	1-4 μ L	
DEPC 处理水			
Total volume	25 μ L	50 μ L	

注意: 引物浓度请以终浓度 0.1-1.0 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。

3. 涡旋震荡混匀, 短暂离心, 将溶液收集到管底。
4. 将热循环仪预热到 45 $^{\circ}$ C, 将 PCR 管置于热循环仪中, 进行 RT-PCR 反应。
5. 反应结束后取 5 μ l 反应产物, 加入适量上样缓冲液后进行电泳检测结果。

反应条件:

反转录: 50°C	15 min	
变 性: 95°C	2.5 min	
变 性: 95°C	20s	} 35~50 个循环
退 火: 50-65°C	25s	
延 伸: 72°C	60s/kb	
72°C	10min	
4°C	Hold	

注意:

1. 一般 PCR 实验中退火温度比扩增引物的熔解温度 T_m 低 5°C，退火时间一般为 20-30 秒，无法得到理想的扩增效率时，适当降低退火温度；发生非特异性反应时，提高退火温度，由此优化反应条件。
2. 延伸时间根据扩增的片段大小设定，本产品中包含的 DNA Polymerase 扩增效率为 1 kb/60s
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，错配几率会增加，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。