THERMOscript One Step RT-PCR Kit

北京艾德莱生物科技有限公司
Aidlab Biotechnologies Co.,Ltd
地　址：北京市海淀区上地紫成创业园 C126--130
电　话：010－82796972/82795296（Fax）
网　址：www.aidlab.cn　邮箱：info@aidlab.cn

包 装 量：

目录编号	包装单位
PC4501	100次×20 μl
PC4502	200次×20 μl

组成	PC4501	PC4502
2×OneStep RT-PCR Mix	1 ml	2×1 ml
THERMOscript OneStep Enzyme Mix	100 μl	2×100 μl
RNase free H_2O	1ml	2×1 ml

产品储存：

储存：−20°C 保存，有效期 12 个月。

制品说明：本试剂盒是专为一步法 RT-PCR 实验配制的，使用该试剂盒能够方便快捷的在同一个反应管内完成逆转录反应和 PCR 扩增反应。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。本试剂盒包括最佳配比优化的 OneStep Enzyme Mix（包含突变改造耐热 THERMOscript M-MuLV H Minus 逆转录酶、热启动 HotMaster Taq DNA 聚合酶和 RNasin 抑制剂 mix），同时包含适用于逆转录和 PCR 扩增的独特 2 ×RT−PCR Mix 反应体系。THERMOscript M-MuLV(RNase H^-)的 RNase H 活性缺失，与 M-MuLV 相比，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 50-55°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。

适用范围：适用于高拷贝、低拷贝基因检测；部分高 GC 含量或具有复杂二级结构的 RNA 模板。

建议反应体系（20 μl−50 μl）：

注意：2×RT−PCR Mix 使用前充分融解颠倒混匀（避免剧烈涡旋产生大量气泡）。短期频繁使用可放 4°C 冰箱。

根据下表冰上配制反应液：

Components	Volume	Final Concentration
2×RT−PCR Mix	10 μl	1 ×
Forward Primer（10μm）	0.4 μl	0.2 μM
Reverse Primer（10μm）	0.4 μl	0.2 μM
THERMOscript Enzyme Mix	1 μl	-
RNA template	X μl	1 ng−0.1 μg
RNase free H_2O to final volume	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。

PCR 扩增：

1. 将配制好的反应体系混匀、离心后。

2. 将热循环仪预热到 50°C−55°C，将 PCR 管置于热循环仪中，按以下反应条件进行反应。

扩增程序：

	温度	时间	循环数
1	50°C−55°C	30 分钟	1
2	94°C	2-3 分钟	1
3	94°C	30 秒	30-40
	50−60°C	30 秒	
	72°C	1-2 kb/分钟	
4	72°C	5-10 分钟	1
5	4°C	保温	

注意：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。

注意事项：

●避免RNase污染。

●为保证反应成功建议使用高质量的RNA模板

●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。

●不能使用 Oligo(dT) 和 Random Primer 合成 cDNA。