

TRUEscript 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

使用说明书

包装量：

组成	PC3401	PC3402
2 XRT-PCR Mix	1.25 ml	2x1.25 ml
TRUEscript OneStep Enzyme Mix	100 μ l	200 μ l
RNase free H ₂ O	1.5 ml	1.5 ml

目录编号	包装单位
PC3401	125次 X20 μ l
PC3402	250次 X20 μ l

产品组成、储存、浓度：

储存：-20°C 保存，有效期 6 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 TRUEscript 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 XRT-PCR Mix 反应体系。本酶 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 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。

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 μ l-50 μ l）：

注意： 2 XRT-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 \times RT-PCR Mix	10 μ l	1 X
Forward Primer (10 μ m)	0.4 μ l	0.2 μ M
Reverse Primer (10 μ m)	0.4 μ l	0.2 μ M
TRUEscript Enzyme Mix	0.8 μ l	-
RNA template	X μ l	1 pg-1 μ g
RNase free H ₂ O to final volume	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。

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 42°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	42°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	1-2kb/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。