

# SuperRT One Step RT-PCR Kit

项目号: S665660(100 rxns)

保存条件: -20°C

## 产品内容

组分	S665660 100 rxns
SuperRT OneStep EnzymeMix	50 $\mu$ l
2 $\times$ SuperRT OneStep Buffer	1.4 ml
RNase-Free Water	1.5 ml

## 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。本试剂盒包括全新高效逆转录酶、快速热启动 DNA 聚合酶, 同时包含适用于逆转录和 PCR 扩增的反应缓冲液和实验中所必需的其它组分。SuperRT 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、延伸速度快的优良性能。独特的缓冲体系使逆转录酶和聚合酶同时发挥最大功效。使用本试剂盒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。

## 注意事项

1. 在操作过程中应避免 RNase 污染, 防止 RNA 降解或实验中的交叉污染, 建议在专门的区域进行 RNA 操作, 使用专门的仪器和耗材, 操作人员戴口罩和一次性手套并经常更换手套。
2. 实验尽量使用一次性塑料器皿, 若使用玻璃器皿, 应使用 0.1%DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液在 37°C 处理 12 小时, 并在 120°C 下高压灭菌 30 分钟后使用, 或者将玻璃器皿在 180°C 下干热灭菌 60 分钟后使用。实验中用到的无菌水应使用 0.1%的 DEPC 处理后进行高压灭菌。

3. 本试剂盒中的所有试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。所涉及的酶类使用后应尽快放回-20℃，避免反复冻融。
4. 本试剂盒必须使用特异性引物，引物的选择可根据具体实验来选择，引物设计的好坏直接影响到 RT-PCR 反应的结果，设计引物时需考虑 GC 含量，引物长度，引物位置，PCR 产物的二级结构等因素，建议采用专业的引物设计软件来设计。

## 使用方法

1. 将 RNA 模板、引物、OneStep RT-PCR Buffer、SuperRT OneStep RT-PCR EnzymeMix 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 $\mu$ l 反应体系	终浓度
2 $\times$ SuperRT OneStep Buffer	12.5 $\mu$ l	1 $\times$
Forward Primer, 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M
Reverse Primer, 10 $\mu$ M	1 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M
SuperRT OneStep EnzymeMix	0.5 $\mu$ l	/
RNA Template	X $\mu$ l	1 pg - 1 $\mu$ g
RNase-Free Water	up to 25 $\mu$ l	/

**注意：**引物浓度请以终浓度 0.1-1.0  $\mu$ 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℃，将 PCR 管置于热循环仪中，进行 RT-PCR 反应。

### 反应条件：

步骤	温度	时间	/
反转录	45℃	30 min	/
PCR 预变性	95℃	2 min	&nbsp;
变性	94℃	30 s	30-40 个循环
退火	55-65℃	30 s	30-40 个循环

延伸	72°C	30 s	30-40 个循环
终于延伸	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/30s。
- 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。
5. 反应结束后取 5  $\mu$ l 反应产物，加入适量上样缓冲液后进行电泳检测结果。