

HP One Step RT-PCR Kit

PCR501



产品概述

Product Overview

RT-PCR Kit 专为以 RNA 为模板(如 RNA 病毒)的终点法 PCR 检测而设计,通过使用基因特异性引物(GSP),将逆转录和 PCR 反应整合在一管内完成,不需要额外的开管/移液操作,节省操作时间的同时提高检测通量,并降低污染的风险。整合 Reverse Transcriptase 以及 Taq HS DNA Polymerase 的优越性能,配合经过优化的缓冲体系,HP One Step RT-PCR Kit 可从1 pg总RNA量中检测到目的片段,并可扩增长达10 kb 的片段。

产品组成

Product Composition

组 分	50 rxns (50 µl/run)
2 × One Step buffer (Dye Plus) ¹	2 × 625 µl
One Step Enzyme Mix ²	125 µl
RNase-free H ₂ O	2 × 1 ml

1. 包含dNTP、甘油及染料

2. 包含RNase Inhibitor

注意事项

Precautions

- 防止 RNase 污染,请保持实验区域洁净;操作时需要戴干净的手套、口罩;实验所用的离心管、枪头等耗材均需 RNase-free 级别。
- 退火温度需要根据引物退火温度调整,一般设置成低于引物退火温度 1~2°C即可。对于>5 kb 的片段,推荐使用长引物, T_m 值在 68 ~ 70°C,把退火/延伸温度合并为 68°C。这样可以显著提高扩增特异性。详见实验流程。
- 对于<5 kb 的片段,延伸时间最少设置为 0.5 min/kb;对于>5 kb 的片段,延伸时间最少设置为 1 min/kb。一般来说,延伸时间的延长有利于提高扩增产量。详见实验流程。

操作流程

Operation Process

1. 反应体系配制

组 分	使用量
RNase-free H ₂ O	Up to 50 µL
2 × One Step buffer (Dye Plus)	25 µl
One Step Enzyme Mix	2.5 µl
Gene Specific Primer Forward (10 µM)	2 µl
Gene Specific Primer Reverse (10 µM)	2 µl
模板 RNA	Total RNA: 1 pg - 1 µg

2. 反应程序

目的片段 >5kb

反应温度	时间	循环数
50°C ^{*1}	30 min	
94°C	3 min	
94°C	30 sec	} 30 - 35 cycles
55 ~ 72°C ^{*2}	30 sec	
72°C	0.5 - 1 min/kb ^{*3}	
72°C	7 min	
4°C	Hold	

目的片段<5kb

反应温度	时间	循环数
50°C ^{*1}	30 min	
94°C	3 min	
94°C	30 sec	} 30 - 35 cycles
68°C ^{*2}	1 min/kb ^{*3}	
72°C	7 min	
4°C	Hold	

1*.如果需扩增基因的 RNA 模板具有复杂二级结构或高 GC 区域，可将逆转录步骤反应温度提高至 55°C，有助于提高产量。

2*.退火温度需要根据引物退火温度调整，一般设置成低于引物退火温度 1~2°C 即可。对于>5 kb 的片段，推荐使用长引物，T_m 值在 68~70°C，把退火/延伸 温度合并为 68°C。这样可以显著提高扩增特异性。

3*.对于 5 kb 的片段，延伸时间最少设置为 1 min/kb。一般来说，延伸时间的延长有利于提高扩增产量。

3. 产物直接用琼脂糖凝胶电泳检测

保存条件

Storage Conditions

-30~-15°C保存，干冰/-20°C运输。