

HP One Step RT-PCR Kit

PCR501

产品概述

Product Overview

本产品专为以 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,可从 1 pg 总 RNA 量中检测到目的片段,并扩增长达 10 kb 的片段。

产品组成

Product Composition

组 分	50 rxns (50 μ L/run)
2 $\times$ One Step buffer (Dye Plus) ^{*1}	2 $\times$ 625 μ L
One Step Enzyme Mix ^{*2}	125 μ L
RNase-free H ₂ O	2 $\times$ 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。
- 退火温度需要根据引物退火温度调整。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 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 μ L
2 $\times$ One Step buffer (Dye Plus)	25 μ L
One Step Enzyme Mix	2.5 μ L
Gene Specific Primer Forward (10 μ M)	2 μ L
Gene Specific Primer Reverse (10 μ M)	2 μ L
模板 RNA	Total RNA: 1 pg - 1 μ g

2. 反应程序

目的片段 < 5 kb

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 > 5 kb

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. 如扩增基因的 RNA 模板具复杂的二级结构或高 GC 含量，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。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。