

2X One Step RT-PCR Mix

货号: RP1001B 规格: 50 rxns

产品组成

Component	RP1001B (50 rxns, 50 µl/rxn)
2X RT-PCR Reaction Mix ^[1]	1.25 ml
RT-PCR Enzyme Mix ^[2]	125 µl
RNase-free ddH ₂ O	1 ml

[1]包含 dNTPs, 以及缓冲液组分; [2]包含逆转录酶, RNase 抑制剂, Hotstart Taq DNA 聚合酶, 热敏型 DNase。

保存条件

-15 ~ -25°C

产品简介

2X One Step RT-PCR Mix 是用于一步完成逆转录+终点法 PCR 的试剂。它以特异性引物 (GSP) 来扩增 RNA 靶标序列。优化的缓冲液组分可以保证在一个体系内完成逆转录和 PCR 反应。本品由 2 倍浓度的反应缓冲液和酶混合液组成, 相比于一管式全预混溶液更有利于各类酶试剂的稳定保存。使用简单方便, 使用时仅需加入 GSP 和模板 RNA, 无需额外的开盖、移液操作, 不仅节省时间, 并能有效降低污染风险。本品含有热敏型 DNase, 逆转录时可同时去除基因组 DNA。热敏型 DNase 高温易失活, 有利于 cDNA 稳定地保存或进行扩增反应。

应用举例

1. 准备反应体系

1.1 按下表配置反应体系。于冰上融化所有试剂。配制多个反应孔时, 请为各组分预留 10% 的余量, 以免移液损失。

组分	体积	终浓度
2X One Step RT-PCR Mix	25 µl	1X
RT-PCR Enzyme Mix	2.5 µl	-
正向特异性引物(10 µM)	2 µl	0.4 µM
反向特异性引物(10 µM)	2 µl	0.4 µM
模板 RNA	根据需要调整	1 pg-1 µg
RNase-free ddH ₂ O	根据需要调整	-
总体积	50 µl	-

1.2 反应体系配好后, 充分翻转混匀, 离心。

2. 运行 RT-PCR 反应程序

快速反应体系 (适合 ≤ 2 kb 的片段):

步骤	阶段	循环数	温度	时间
----	----	-----	----	----

逆转录	1	1	50°C ¹	30 min
预变性	2	1	95°C	2 min
变性	3	30~35	95°C	30 sec
退火			55~68°C ²	30 sec
延伸			72°C	按 0.5 min/kb 设置时间
最终延伸	4	1	72°C	5~10 min

标准反应体系 (适合 > 2 kb 的片段):

步骤	阶段	循环数	温度	时间
逆转录	1	1	50°C ¹	30 min
预变性	2	1	95°C	2 min
变性	3	30~35	95°C	30 sec
退火			55~68°C ²	60 sec
延伸			72°C	按 1 min/kb 设置时间
最终延伸	4	1	72°C	5~10 min

1. 逆转录反应的温度可以在 48°C 至 55°C 之间进行调整。如果模板具有复杂二级结构或高 GC 区域, 设置为 55°C 有助于提高产量。

2. 变性温度设置为引物 T_m-5°C 左右

3. 结果分析

产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测和分析。

注意事项

- 操作过程中注意防止 RNase 污染, 佩戴干净的口罩和手套, 使用的耗材需为 RNase-free
- 请使用质量较高的 RNA 作为模板, 降解的 RNA、RNase 及其他杂质的存在会影响逆转录的效率
- 引物长度应设计在 18-30 个碱基之间, GC 含量在 40~60% 之间

本品仅供科学研究使用。