

描述: 本试剂采用稳定高效的 RT-PCR 预混体系, 是以 RNA 为模板进行一步法 RT-PCR 的专用试剂。其原理为用基因特异性引物进行反转录反应, 获得第一链 cDNA (不可使用 Oligo (dT) 或 Random Primer 合成第一链 cDNA), 再使用基因特异性正向引物和反向引物进行 PCR 扩增, 在同一反应体系中一步完成从反转录到 PCR 的全部过程。反应体系中已含有电泳所需的指示剂 (蓝色和黄色), 反应后可以直接进行电泳。

在本试剂盒中, 将耐热 M-MLV 反转录酶、Rnase Inhibitor、Hotstart 高保真 DNA 聚合酶以及稳定剂等配制成 50×One-Step Enzyme Mix 预混液; 反应 Buffer、dNTP 以及电泳指示染料配制成 5×HiFi One-Step RT-PCR Buffer, 因此使得操作更加简单便, 扩增产物可用于平端克隆和 DNA 测序。

主要优势:

- 耐热 M-MLV 反转录酶可在 55℃ 反应能更好的打开复杂二级结构, 只需 10min 即可完成逆转录。
- DNA 聚合酶为热启动型高保真酶, 能够有效的抑制非特异性反应且具有较高的校正活性, 酶激活仅需 2min。
- 具有宽泛的模板量兼容性, 10 ng~1μg 都可有效扩增。
- 反应过程中无需开盖, 避免了操作过程中的污染危害。

组分

名称	250T
50×One-Step Enzyme Mix	100 μl
5×HiFi One-Step RT-PCR Buffer	1 ml
RNase Free H ₂ O	1 ml×3

储存: 请置于 -20℃, 可保存 2 年; 避免反复冻融。

注意:

1. 50×One-Step Enzyme Mix 粘度高, 第一次使用之前要离心收集至反应管底部, 吸取时应缓慢小心。

2. 由于使用了 Hotstart 高保真 DNA 聚合酶, 反应配制可在常温进行, 但各组分应 -20℃ 保存。

实验操作和反应条件:

1. 按以下组分配制反应液

RNA(病毒 DNA/RNA 样品直接使用 2~10μl)	10 ng~1 μg
5×HiFi One-Step RT-PCR Buffer	4 μl
50×HiFi One-Step RT-PCR Enzyme Mix	0.4 μl
基因特异性上游引物 (10μM)	0.8 μl
基因特异性下游引物 (10μM)	0.8 μl
RNase Free H ₂ O	Up to 20 μl

注意: 超过 1 μg 的 RNA 模板量会抑制 PCR 反应, 建议第一次可使用 200 ng 的 RNA 模板, 然后根据结果进行优化。

2. 在 PCR 仪上按以下条件进行 RT-PCR 反应:

55℃, 10min	逆转录反应
95℃, 2min	失活 M-MLV, 并激活高保真聚合酶
95℃, 20s	30~40 cycles
T _M ℃, 20s	
72℃, 2Kb/min	
72℃, 2min	末端延伸

3. PCR 反应结束后, 可取 5 μl 产物直接进行电泳检测。预混液中已经包含绿色染料, 无需再加入 DNA Loading Buffer。1% Agarose 电泳时, 蓝色指示剂指示 3~5 kb, 黄色指示剂指示 <50 bp。